Manual del usuario

Medios de Cultivo para Reproducción Asistida

electrónica edición 010905-2.0

MediCult
Innovation with Care

Abreviaturas usadas en el manual

SSR®	= Reemplazo del suero sintético (En USA: Suplemento ART)
HSA	= Albúmina de suero humano
EBSS	= Solución salina balanceada de Earle
PBS	= Tampón salino de fosfato Dulbecco

Agradecimientos
MediCult agradece al Dr. Lars Johansson
por su ayuda en la preparación de este manual.

© Copyright MediCult a/s, Denmark, 2005.

CONTENIDO

Explicaciones graficas **2**

Introducción **3**
Tecnología 3
Control de calidad **4**
Rango de productos **6**
Sistemas tampón 6
Los medios 6

Manipulación de gametos y embriones **8**
Ajustes de la incubadora 8
Preparación y pre-equilibrio de los medios 9

Preparación del esperma **10**
Nomenclatura- variables del semen 10
Swim-up 10
Densidad de gradientes 13

Recuperación de ovocitos **16**
Evaluación de la calidad de los ovocitos 16
Etapas de maduración de los ovocitos (ICSI) 16

Inseminación **19**
Evaluación de la fertilización (Día 1) **20**

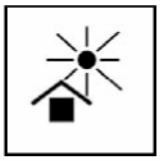
Medios de cultivo **21**
Como elegir un medio de cultivo 21

Cultivo de embriones **23**
Día 2 transferencia de embriones 27
Día 3 transferencia de embriones 29
Cultivo extendido (Día 5-6) 31
Transferencia embrionaria (ET) **34**

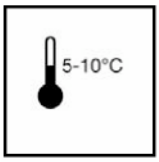
Micromanipulación **35**
Introducción 35
Denudación de los ovocitos para el ICSI 35
Preparación del recipiente de inyección 40
Inmovilización del esperma 40
El método ICSI 46
Perforación de Zona 48
Biopsia del embrión 49

Criopreservación **53**
Criopreservación de espermatozoides 53
Congelado ovocitos 56
Descongelado ovocitos 60
Congelado pre-cigotos (2PN) y embriones en etapa de división celular 62
Descongelado pre-cigotos (2PN) y embriones en etapa de división celular 65
Congelado de blastocistos (Día 5) 67
Descongelado de blastocistos 70
Vitrificación 73

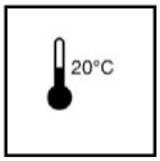
Explicaciones gráficas



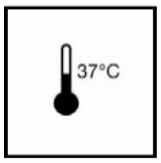
Proteger de la luz



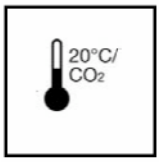
Temperatura



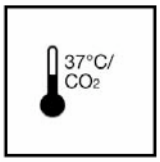
Temperatura ambiente



Platina Térmica



Temperatura ambiente con control de CO_2

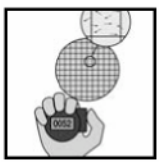


Mantener en la incubadora

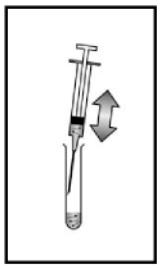
Tiempo en segundos

Tiempo en minutos

Tiempo en horas

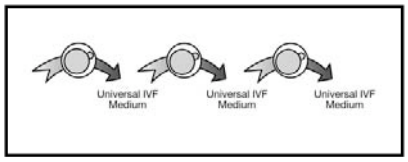


Recuento de espermatozoides



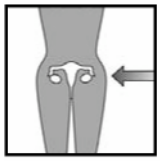
Aspiración de espermatozoides

Pipeteo hacia arriba y hacia abajo



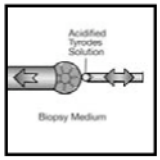
Proceso de lavado

Centrifugado

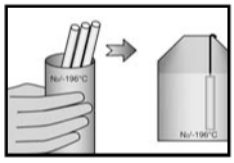


Transferencia embrionaria (ET)

Cambio de medio de cultivo



Fijado del embrión con la Pipeta de sostén y exposición de la zona pelúcida a la Solución Acidulada de Tyrodes



Transporte y transferencia al tanque con nitrógeno líquido

Tubo de ensayo con tapa

INTRODUCCION

MediCult esta orgulloso de ser la primera y actualmente una de las compañías líderes en producir medios para técnicas de reproducción asistida (ART) listos-para-utilizar. La compañía, fundada en el año 1987, estaba dedicada en el negocio de los medios ART, y actualmente sigue ofreciendo al público un óptimo y completo rango de productos presentando constantemente nuevos productos y nuevos métodos para control de calidad (QC).

Este manual contiene recomendaciones detalladas que abarcan el uso de los productos MediCult para obtener resultados óptimos. Todos los métodos descriptos están basados en experiencias clínicas con nuestros productos. MediCult les agradece a los técnicos de laboratorio y a los científicos que contribuyeron con su experiencia.

Tecnología

SSR® (Reemplazo de suero sintético)
(USA: ARTS™ Suplemento ART)

Tradicionalmente, el suero de pacientes fue usado como una fuente de proteínas para el cultivo de embriones. Sin embargo, el uso del suero paciente tiene bastantes inconvenientes. Por ejemplo, las proteínas del suero tienen macromoléculas adosadas, las cuales incluyen hormonas, vitaminas, ácidos grasos, iones metálicos quelados y pirógenos. La concentración de esas macromoléculas puede variar dependiendo del paciente y del ciclo menstrual. Esto hace que la comparación entre series de medio que contienen suero paciente sea prácticamente imposible. Asimismo, hay evidencia que el suero paciente contiene sustancias que son perjudiciales para embriones *in vitro*. El uso de HSA de grado farmacéutico supera estas desventajas. SSR® esta completamente definido químicamente y esta libre de proteínas, lípidos y glicanos, excepto por la presencia de insulina humana recombinante.

En 1990 Holst *et al.,* uso un medio con SSR® de MediCult complementado con un 1% de HSA en una prueba clínica. Usando este sistema, obtuvieron índices de fertilización, división celular e implantación equivalentes comparados a la complementación de suero. Forsdahl *et al.,* 1994 y Bertheussen *et al.,* en 1997, mostraron que el medio Universal IVF libre de suero y el medio M3 fueron capaces de soportar el desarrollo *in vitro* de embriones humanos hasta la etapa de blastocisto, sin perjudicar el proceso de fertilización o el índice de implantación.

Hoy los medios de MediCult contienen SSR®, su composición ha sido patentada en todo el mundo.

Todos los productos SynVitro® son puramente sintéticos y definidos químicamente. Estos productos no contienen HSA u otros componentes de origen biológico. Tampoco contienen antibióticos o Rojo Fenol. La formula contiene SSR®, que aumenta la consistencia y la estabilidad del producto durante su periodo de conservación.

Referencias

Las referencias mencionadas están a su alcance y por pedido a MediCult.

Control de Calidad

La calidad es nuestra piedra angular

Para MediCult, ofrecer productos de alta calidad, que aseguran resultados consistentes y óptimos y a su vez son seguros para nuestros pacientes, es esencial.

Las quejas son tratadas de acuerdo a procedimientos documentados, para asegurar una rápida respuesta para las observaciones del cliente. Acciones correctivas y preventivas pueden ser implementadas en caso de necesidad.

La reacción del cliente es crucial, Usted es la fuente de inspiración para que nuestros productos sigan mejorando día a día.

Los medios de cultivo de MediCult tienen un nivel de endotoxina de ~ 0.1 EU/ml que asegura la mejor condición para los embriones.

Estándares

Las instalaciones de manufactura, operan con un sistema asegurador de calidad ISO 9001 e ISO 13485 en la sede de Medicult en Jyllinge, Dinamarca. Este sistema es revisado regularmente para ser renovado. Todos los procedimientos operativos son conformes a los principios de GMP (Practica de buena manufactura). El proceso de manufactura es llevado a cabo en salones limpios clasificados como clase GMP D y A.

El monitoreo y los tests de control de calidad son realizados en todos las etapas del proceso, desde el recibo de las materias primas hasta el producto final.

MediCult fue el primer distribuidor de medios ART en obtener certificados basados en estos estándares.

Los productos vendidos en USA tienen 510 (K) aprobaciones de la FDA.

La seguridad del paciente, primero

Para MediCult es muy importante distribuir medios que sean seguros para el paciente:

- SSR® (Reemplazo de suero sintético: en USA, Suplemento ART) es usado para reemplazar en parte la HSA.
- Materias primas de grado farmacéutico como fuente de proteínas (ej. Albúmina de suero humano) y otros ingredientes activos.
- El agua de MediCult cumple con los requisitos de Ph Eur para agua purificada.
- Los métodos farmacopeicos para el control de calidad son aplicados en tanto estén disponibles.
- El periodo de conservación es validado (la estabilidad es evaluada en condiciones similares a las de uso)
- Los productos son empacados en cajas a prueba de violaciones con un prospecto completo adicional.
- El envío de los productos se realiza en cajas aislantes con elementos que aseguran condiciones térmicas óptimas.

Test de control de calidad

Los productos finales son testeados con una combinación de los siguientes tests QC, de acuerdo con nuestras especificaciones:

- **Test de pH (Ph. Eur. Edición actual)**
- **Test de osmolaridad (Ph. Eur. Edición actual)**
- **Ensayo de embriones de ratón (MEA)**

  Embriones de ratones de 1 célula o de 2 células son cultivados de acuerdo al uso destinado.

  Los embriones son cultivados en un medio de testeo y en un medio de control por 72 horas (para 2 células) o por 96 horas (para una célula) respectivamente. MediCult requiere un mínimo de 80% de índice de formación para blastocistos expandidos.

  (Las pautas de FDA requieren un 70% de índice de formación para blastocistos expandidos)

  Todos los resultados finales relevantes son testeados por un test de MEA.

- **Hybritest™**

  El patentado Hybritest™, es empleado en condiciones libres de proteínas. Esto incrementa la sensibilidad del test a las sustancias toxicas sin efectos de “enmascarado” de proteínas, particularmente albúmina. La combinación única del Hybritest™ y del test MEA, asegura que la clínica puede estar segura que los medios no son tóxicos para los embriones.

  Las células del hibridoma son cultivadas en medio de testeo por 4 días. MediCult requiere un mínimo incremento de 10 veces en el conteo de células después de 4 días. Materias primas criticas están sujetas a inspección con el Hybritest™.

〈 **Test de endotoxinas LAL (Ph.Eur.)**

MediCult ofrece productos con en menor limite de endotoxinas en medios ART listos-para-usar en el mercado. Los medios de cultivo MediCult tienen un nivel de endotoxinas de ~ 0.1 EU/ml, para asegurar las mejores condiciones para los embriones.

〈 **Test de esterilidad (Ph.Eur. edición actual)**

Todos los productos son filtrados de modo estéril y cada serie es testeada por su esterilidad.

- **Test de supervivencia del espermatozoide**

Este test tiene como intención demostrar la ausencia de sustancias que reducirían la viabilidad de los espermatozoides.

El test de supervivencia del espermatozoide esta basado en el CASA (Análisis de semen automatizado por computadora) en resolución con VAP (velocidad de camino), VSL (velocidad progresiva promedio), VCL (rapidez de camino) y frecuencia de latido. La incubación en el medio toma hasta 18 horas.

- **Test de inmovilización del espermatozoide**

La esperma con características motrices normales son mezcladas con el medio. Para aprobar el test, el VAP, VSL y VCL de la esperma suspendida en el medio debe estar por debajo de los 30 µm/seg.

VARIEDAD DE PRODUCTOS

Sistemas tampón

Bicarbonato de sodio

El bicarbonato es un tampón intracelular muy importante y ha demostrado ser esencial para el desarrollo del embrión al ser combinado con CO_2 (Bavister *et al.* 1995). El bicarbonato no solo forma parte de los medios de cultivo, sino también en nuestros medios tampones HEPES para gametos.

Para aquellos procedimientos que requieren un medio tampón de bicarbonato, las formulaciones han sido diseñadas para dar un pH de 7.2-7.4 en una atmósfera de 5.6% CO a 37°C.

HEPES

El medio tampón HEPES ha sido formulado para dar un pH de 7.3-7.5 en el aire a 37°C. Esto hace posible manipular gametos fuera de la incubadora.

Tampón de fosfato

La criopreservación de embriones en etapa de división celular es realizada en soluciones de tampón de fosfato, que mantendrían un pH de 7.2-7.4 en el aire.

Los medios

Todos los medios son formulados con soluciones salinas fisiológicas, con el fin de minimizar el estrés osmótico o por pH producido al cambiar de una solución a otra. Al ser el único proveedor de medios en el mundo, MediCult ofrece un rango de productos con y sin Fenol Rojo.

No ajuste el pH usando HCl, NaOH o $NaHCO_3$, ya que el fluido agregado puede alterar la concentración de otros ingredientes importantes, como el piruvato u los aminoácidos, también puede alterar la osmolaridad y la esterilidad del medio.

Con Rojo Fenol:

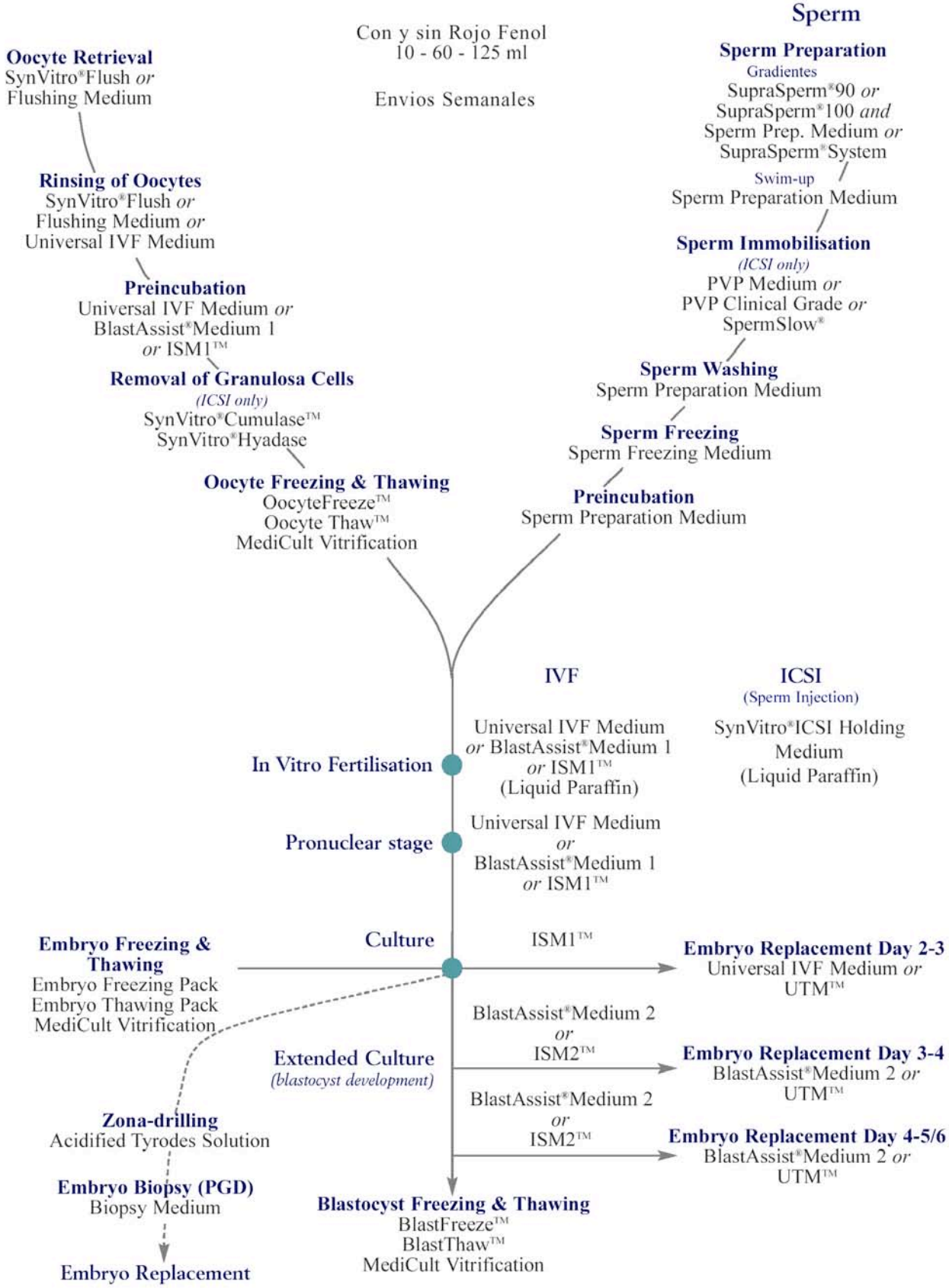
HEPES / tampón de bicarbonato	Tampón de bicarbonato
Flushing Medium	Medio Universal IVF
Medio de preparación de la esperma	ISM1™
SupraSperm®90	ISM2™
Sistema SupraSperm®	UTM™
Medio PVP	Sistema BlastAssist®
	BlastFreeze™
	BlastThaw™

Sin Rojo Fenol:

HEPES / Tampón de bicarbonato	Tampón de bicarbonato	Tampón de fosfato
SynVitro ® Flush	Medio Universal IVF	OocyteFreeze™
Medio de preparación de la esperma	ISM1™	OocyteThaw™
SupraSperm® 100	ISM2™	
Grado clínico PVP	UTM™	pack de congelado de embriones
SynVitro ®Cumulase™ (solo HEPES)	Sistema BlastAssist®	pack de descongelado de embriones
SynVitro ®Hyadase	SperrmSlow	
Medio de cultivo ICSI SynVitro ®		
Medio de biopsia		
Medio de congelado de esperma		
Vitrificación MediCult		

MediCult provee una linea completa de Medios para ART

Un producto para cada etapa de las Tecnologias de Reproducción Asistida



MANIPULACIÓN DE GAMETOS Y EMBRIONES

Un factor importante para el éxito de la tecnología de reproducción asistida, es recordar que usted esta trabajando con materiales "vivos". Por ende, usted debe ponerse en lugar del gameto o del embrión cuando usted los esta manipulando.
Los ovocitos y los embriones son muy sensibles y no deberían ser expuestos a grandes cambios de temperatura o pH. Ambos prefieren 37°C y un pH neutro. Los espermatozoides son mucho más tolerantes a la temperatura, osmolaridad y pH. Sin embargo toleran mejor el pH alcalino que el acido.

Consideraciones generales

- Organizar y preparar con tiempo.
- Asegurarse que todo el equipamiento este bien mantenido y sea controlado regularmente.
- Todos los procedimientos deben ser realizados en un ambiente de trabajo limpio.
- Se recomienda el uso de filtros de carbono para purificar los gases entrantes.
- Asegurarse que los guantes no sean tóxicos.
- Estar alerta de la presencia de potenciales contaminantes ambientales, como alcohol u otros agentes de limpieza. Los carbones orgánicos volátiles pueden ingresar por medio del aire acondicionado.
- Utilizar solamente productos de calidad controlada para cualquier procedimiento de ART. Mantener un registro de todos los productos y de los procedimientos realizados.
- Técnicas asépticas deben ser utilizadas con todas los recipientes/ viales abiertos. Los medios deben ser manipulados en un gabinete de flujo laminar.
- La fecha de uso debe ser escrita en una etiqueta, los contenidos deben mantenerse a 2-8°C y deben ser usados en 1-7 días.
- Anteriormente al uso todos los medios deben ser pre-calentados completamente o pre-equilibrados dependiendo del sistema tampón.
- Las perdidas de temperatura ocurren rápidamente y están relacionadas a la cantidad de tiempo que una placa de cultivo pasa fuera de la incubadora. El uso de platinas térmicas, por ejemplo, y platinas térmicas para microscopio pueden compensar esta perdida.
- Los cambios en la osmolaridad ocurren lentamente, por ende es importante mantener los medios en un ambiente correctamente húmedo o cubierto con parafina liquida.
- El tiempo de manipulación de los gametos (especialmente los ovocitos) y embriones fuera de la incubadora debe ser el mínimo.
- Estar alerta de la potencial toxicidad de los embriones por las placas IVF/ICSI. Use materiales testeados por MEA preferentemente.

Condiciones de la incubadora

Por muchos años, las condiciones de una incubadora estándar, en la mayoría de los laboratorios ART, ha sido 5% CO, en aire con pequeños ajustes dependiendo de la altura sobre el nivel del mar.

- Los medios MediCult son diseñados para dar resultados óptimos usando un 5% de CO_2, ambiente, pero también pueden ser usados en 6% de CO_2.
- Es recomendable usar 5% de O_2, particularmente para cultivo de blastocistos aunque los medios MediCult contengan Reemplazos de Suero Sintético (SSR®) para minimizar el estrés oxidativo.
- Si es posible, minimice el número de aperturas, teniendo diferentes incubadoras para medios de equilibrandose y cultivo.

Dióxido de Carbono (CO_2)

El CO_2 es una parte del sistema tampón de bicarbonato con la reacción equilibrante.

$$CO_2 + H_2O \Leftrightarrow H_2CO_3 \Leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$$

Los medios MediCult contienen HCO_3- en una concentración correspondiente al pH 7.2-7.4 cuando son equilibrados en CO_2 5-6 %. El pH es una medida de la concentración de H^+. Cuanto más alta es la concentración de pH se mide la concentración de H^+ Cuanto más alta es la concentración de CO_2 en el medio, más bajo es el pH. Nosotros generalmente recomendamos un 5% de CO_2.

Otra consideración a tener en cuenta al tomar una decisión sobre la concentración de CO_2., en la cantidad de trabajo de la incubadora. Cuantas más veces se abra y se cierre la incubadora, menor va a ser la concentración de CO_2 en la incubadora y mayor va a ser el tiempo de equilibrio. Por ende, ser recomienda tener incubadoras diferentes para el equilibrio y el cultivo, aumentando la concentración de CO_2 al 6% mientras el nivel de trabajo aumenta.

Oxigeno (O_2)

El consumo de oxigeno es relativamente constante desde la etapa unicelular hasta la etapa mórula, para crecer abruptamente en la etapa de blastocisto (Thompson JG *et al.,* 1996; Houghton FD *et al.,*1996).

La concentración de O_2 en el oviducto es 40% o menos de la que se encuentra en la atmósfera (Leese HJ, 1995). El útero tiene una concentración aun menor (Fisher & Bavister, 1993). Por ende, los embriones se encuentran con un cambio de concentración de oxigeno, al progresar por el tracto reproductivo.

Se ha demostrado que en condiciones en las que la concentración de oxigeno está en el rango del 5-7% durante la incubación, se produce un aumento en la proporción de los embriones de ratón que están por alcanzar la etapa de blastocisto y en el numero de células en el blastocisto.

La actividad metabólica del embrión cultivado bajo tensión O_2 correlaciona mejor con condiciones *in vivo*. Los embriones muestra un incrementada recepción de oxigeno y oxidación de piruvato en comparación con embriones cultivados en 20% O, (Hooper *et al.,* 2001). Aunque se le reduzca el O, la tensión al 2% ha demostrado ser beneficiosa para los avances en los embriones bovinos luego de la compactación (Thompson *et al.,* 2000).

La reducción de la concentración de O, en la incubadora al 2-7% puede resultar beneficiosa durante el cultivo *in vitro* de embriones humanos. Recomendamos utilizar el 5% O_2.

Preparación del medio & pre-equilibrio

0.5 - 1 ml cavidades con o sin capa de Parafina Liquida.

10 - 100 µl microgotas cubiertas con Parafina Liquida.

- Primero etiquetar los recipientes con ID de cada paciente y luego agregar el medio y la Parafina Liquida utilizando pipetas esterilizadas.
- Cuando se preparan las microgotas, asegurarse de cubrir inmediatamente con Parafina Liquida para evitar evaporación.
- Todos los recipientes del cultivo (cavidades o microgotas) deben ser preparados en la tarde previa al día de uso (Día -1). Esto se llevara a cabo para dar suficiente tiempo para el pre-equilibrado en un ambiente de CO, y O.
- Tiempo mínimo de equilibrio es 1 hora por cm (=altura) de medio. Esto corresponde a un mínimo de 2 horas de equilibrio de placas de Petri o platos con microgotas cubiertas con Parafina Liquida pre-equilibrada.
- El medio de cultivo debe ser reemplazado como mínimo cada 48 horas para mantener condiciones de cultivo óptimas.

El medio solo optimiza los resultados si el pH y la estabilidad de la temperatura son mantenidos estrictamente.

Preparación de Esperma

La preparación de esperma es llevada a cabo para remover el plasma seminal, los espermatozoides muertos, y otras células, así como la selección del mejor espermatozoide.

La selección del método de preparación de esperma esta basada en la historia del paciente y en previos análisis de semen así como la evaluación de la actual muestra. Otro aspecto que debe ser considerado es, si la fertilización será llevada a cabo por FIV o ICSI dado que más espermatozoides son necesitados para la inseminación para FIV.

〈 La primera porción de eyaculación contiene la mayoría de los espermatozoides (fracción alta) mientras que el resto de la eyaculación consiste mayoritariamente de secreción de la vesícula seminal (fracción baja). Es por lo tanto de máxima importancia que las primeras gotas de eyaculación sean recolectadas en probetas proporcionados para la recolección de esperma.

〈 El tiempo desde la eyaculación hasta el comienzo de la preparación de esperma no debería exceder los 60 minutos.

Una muestra de semen se licua de entre 30-60 minutos posteriores a la eyaculación.

Incubando el esperma en el plasma seminal por demasiado tiempo reduciría la recuperación del esperma móvil y dejara al espermatozoide incapaz de que experimente los cambios que hacen posible la fertilización.

No se recomienda centrifugar el semen solo dado que potenciales células redondas toxicas y espermatozoides muertos se concentrarían alrededor del espermatozoide móvil.

〈 Para manipular muestras de semen viscoso, se puede mezclar el Medio de Preparación de Esperma con la muestra de semen previo a la preparación de la muestra.

Nomenclatura – variables de semen

Normospermia: = 2 ml semen

Normozoospermia: = 20 mill espermatozoides/ml
= 40 mill espermatozoides en total >25% a o >50% a + b
= 15% espermatozoides normales (WHO)

Asthenozoospermia = 50% a + b or = 25% a

Oligozoospermia < 20 mill / ml

Severa oligozoospermia < 10 mill / ml

Teratozoospermia < 15% formas normales

Aspermia	No eyaculado
Azoospermia	No espermatozoides en el eyaculado
Necrozoospermia	Solo espermatozoides muertos
OAT	Oligoastenoteratozoospermia

Swim-up

Este método es comúnmente utilizado en muestras de semen con cantidad de espermatozoides móviles y para seleccionar al espermatozoide basándose en su motilidad, idealmente seleccionando los espermatozoides vivos.

Sperm Preparation Medium (N. Cat. 1070, 1069 y1068) es un medio tampón modificado EBSS con bicarbonato y HEPES para mejorar la estabilidad en el aire del pH. El medio contiene glucosa, piruvato, SSR® y HSA.

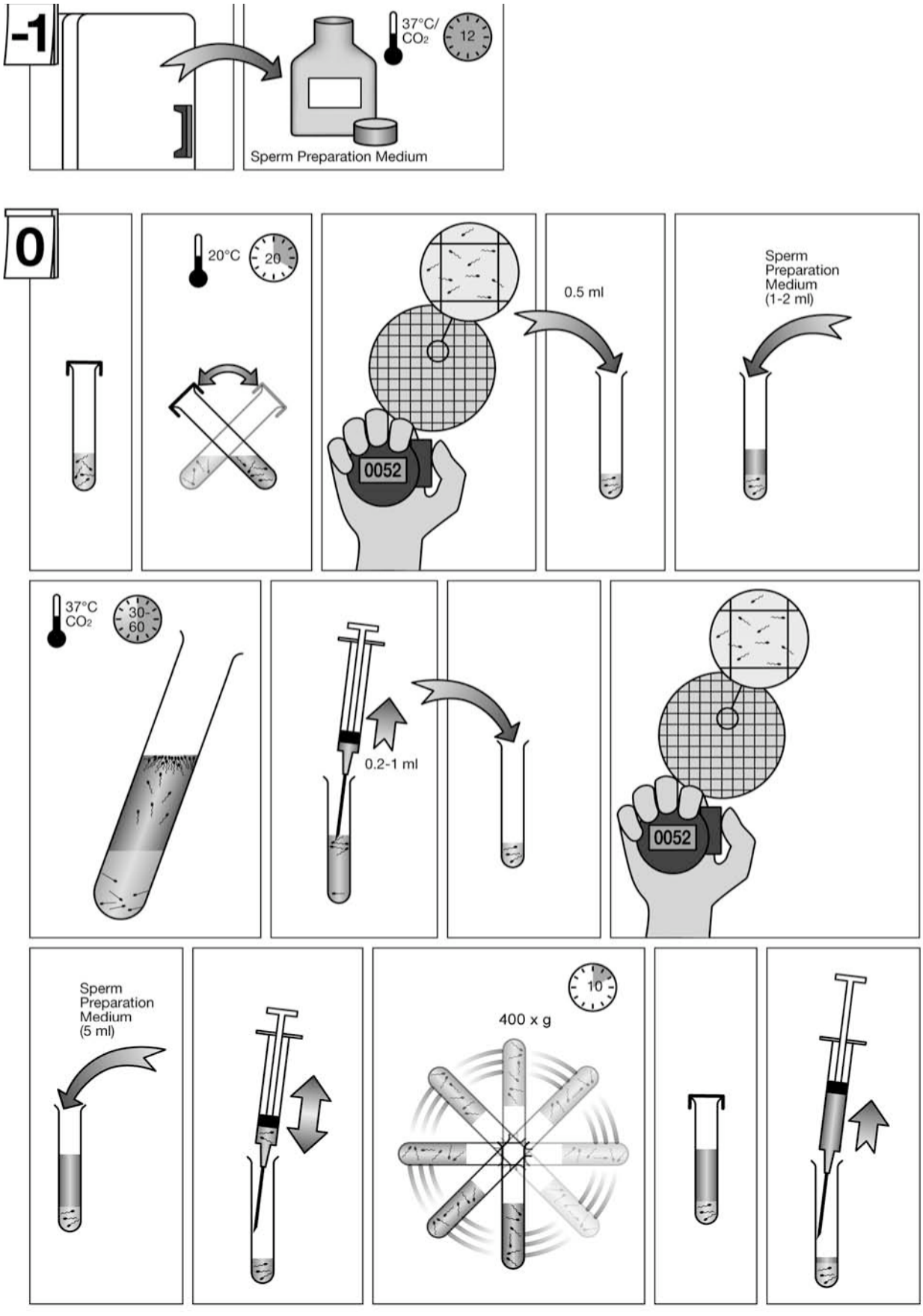
Medio de Preparación de Esperma es listo-para-ser-utilizado, y disponible con o sin Rojo Fenol.

La versión con Rojo Fenol esta disponible con o sin antibióticos. (Penicilina / Estreptomicina).

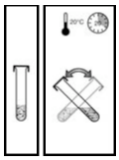
Manejo:

Equilibrar en CO_2 por un mínimo de 2 horas, a 37°C previo al uso.
El Medio de Preparación de Esperma mantendrá estable su pH fuera de la incubadora hasta por 15 minutos. Si es tapado, la estabilidad del medio aumentará a 1 hora dentro de la incubadora.

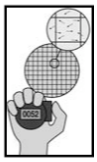
Rápida Referencia
Sperm Preparation Medium



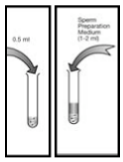
Instrucciones para uso (Swim-up):



1. Después de la recolección del esperma, la muestra es mezclada (Ej.: mover el tubo durante 20 minutos a temperatura ambiente) Si la muestra no se licua pude ser necesario pasarla a través de una pipeta angosta y/o mezclarla con una pequeña cantidad de Sperm Preparation Medium.



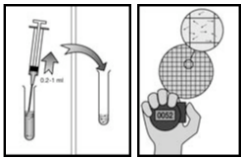
2. Después que el proceso de licuado es completo, se deberá evaluar la concentración y motilidad espermática en el microscopio y determinar el método de lavado.



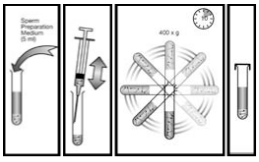
3. Rotule un la cantidad necesaria de tubos con la identidad del paciente.

4. Cuidadosamente coloque 0,5-1 ml de esperma licuado en cada tubo por debajo de 1-2 ml de Sperm Preparation Medium pre-equilibrado.

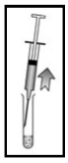
5. Los tubos son colocados en un porta tubos, si es posible angularmente para poder incrementar la interfase entre la muestra de semen y el Sperm Preparation Medium. Esto es llevado a cabo para incrementar la recuperación de la mayoría de espermatozoides móviles mientras ellos migran dentro del medio.
   Colocar el porta tubos en un incubador con CO, y a 37°C por 30-60 minutos dependiendo de la calidad del semen. El swim-up también puede ser llevado a cabo a temperatura ambiente, en ese caso las tapas de los tubos son apretadas para mantener el pH del medio estable.
6. Después del swim-up aspire 0,2-1 ml de la porción superior del medio para evaluar concentración y motilidad. Si el conteo es bajo, agregue los próximos 0,5 ml. Junte todos los sobrenadantes.



Nota! Durante la aspiración del sobrenadante se debe tener cuidado en no alterar la interfase entre el esperma y el medio.



7. Determine la motilidad y concentración del esperma en la muestra lavada.
8. Si se necesita concentrar la muestra adicione 5 ml de medio pre-equilibrado, mezcle y centrifugue a 400 x g por 10 minutos.



9. Aspire el sobrenadante y de acuerdo al procedimiento del laboratorio resuspenda el pellet en un volumen adecuado de medio. En circunstancias normales, la fertilización a través de FIV se hará con una concentración final de 100,000 espermatozoides moviles/ml.

Cuando las tapas de los tubos son cerradas el semen preparado puede ser mantenido en temperatura ambiente (20-25° C) por no más de una hora previa a la inseminación. Se recomienda que la muestra de esperma sea envuelta en un papel de aluminio. Alternativamente la muestra de esperma no envuelta puede ser almacenada en una incubadora con conrol de CO, y a 37°C.

Gradiente de Densidad

Este método es comúnmente utilizado en muestras de semen con calidad pobre y/o un número grande de otras células. Los espermatozoides son seleccionados basándose en su densidad específica y bajo fuerza centrifugas, idealmente seleccionando solo los espermatozoides maduros.

SupraSperm® (N. Cat. 1091, 1092 y 1097) es una suspensión coloidal de partículas de sílice establecidas con silane de enlace covalente hidrofilico y diluida en Medio de Preparación de Esperma. Soluciones de diferentes densidades son puestas en capas en un tubo centrífugo que va creando una densidad de gradiente.

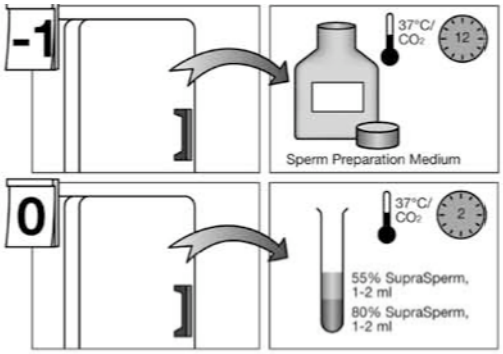
SupraSperm® esta disponible en soluciones en venta o como el listo-para-ser-utilizado SupraSperm®System (N. Cat. 1092), que consiste en dos soluciones: 55% y 80%.

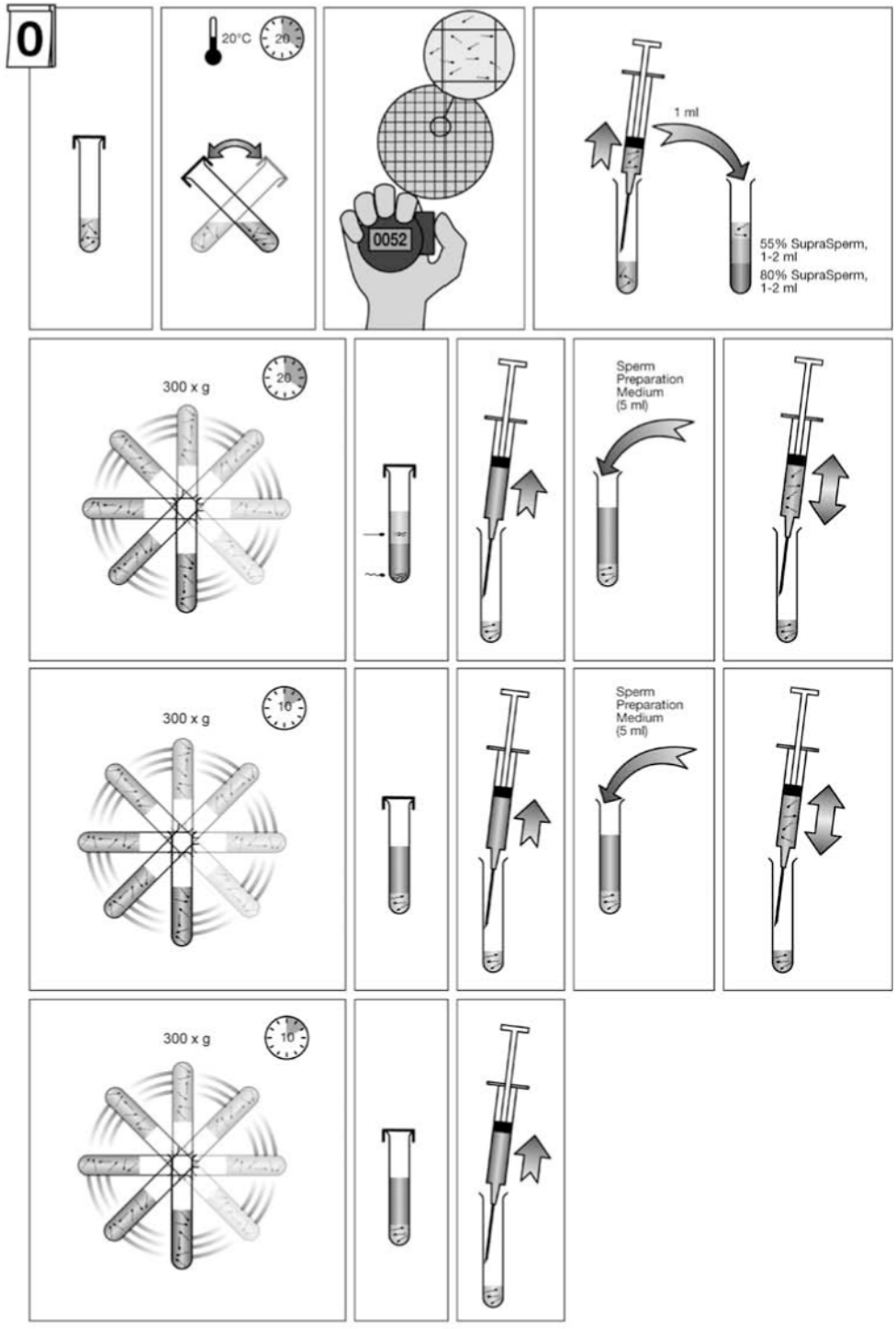
Manejo:

Equilibrar por un mínimo de 2 horas en CO, a 37°C previos al uso.

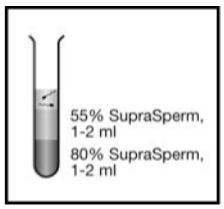
SupraSperm® mantendrá el pH estable fuera de la incubadora hasta por 15 minutos. Cuando se le coloca una tapa la estabilidad del pH del medio aumenta hasta 1 hora de mantenimiento fuera de la incubadora.

Rápida Referencia
SupraSperm®



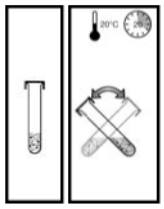


Instrucciones de uso (Densidad del gradiente):



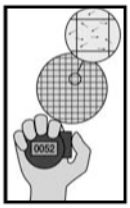
1. Para cada muestra de semen preparar gradientes separados para cada volumen de 1 ml. Cada gradiente es preparado utilizando una capa baja 1-2 ml de 55% SupraSperm® con 1-2 ml de 80% de SupraSperm®, y pre-equlibrado en CO_2 a 37°C.

NOTA! Los gradientes deberán ser preparados inmediatamente antes de ser utilizados para obtener los más óptimos resultados.



2. La muestra de semen es mezclada por completo (i.e. repitiendo el mezclado por 20 minutos a temperatura ambiente). Si la muestra no se licua, será necesario pasarla por una pipeta angosta y/o mezclarla con una pequeña cantidad de Medio de Preparación de Esperma pre-equilibrado.

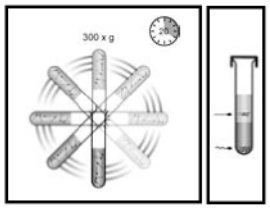
3. Luego que el proceso de mezclado sea completado, la concentración de esperma y motilidad será evaluada.



4. Con cuidado distribuir 1 ml de muestra de semen licuado por encima del gradiente ya preparado.

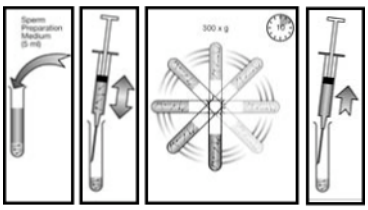
NOTA! Agregando demasiado esperma podría resultar un sobrecargo y de pobre separación saturando el gradiente.

5. El gradiente es centrifugado a 300 x g por 20 minutos

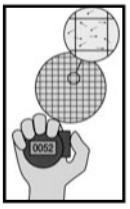


6. Remover el sobrenadante de la pastilla y tener cuidado de no dejar residuos en las paredes del tubo. Transferir la pastilla con lo menos posible del 80% de la solución posible en un tubo centrífugo limpio.

7. Re-suspender la pastilla en 5 ml de Medio de Preparación de Esperma pre-equilibrado y centrifugar nuevamente a 300 x g por 10 minutos. Aspirar el sobrenadante. *Repetir este procedimiento de lavado dos veces.*



8. Agregar una pequeña cantidad de Medio de Preparación de Esperma y determinar motilidad y concentración de espermatozoides en la muestra lavada.
9. Finalmente, re-suspender el esperma lavado en un volumen conveniente de Medio de Preparación de Esperma pre-equilibrado. En circunstancias normales, la fertilización ocurrirá si la inseminación FIV es llevada a cabo en una concentración final de 100.000 espermatozoides / ml móviles.



NOTA! Los tiempos de centrifugado pueden cambiar a 15 minutos en todos los pasos si se tienen varias muestras de esperma en un día y ninguna posibilidad de utilizarlos a todos paralelamente.
Cuando las tapas de los tubos son apretadas el semen preparado puede ser mantenido a temperatura ambiente (20-25° C) por hasta una hora previa a la inseminación. Se recomienda que la muestra de esperma sea envuelta en papel de aluminio. Alternativamente la muestra del esperma que no ha sido envuelta puede ser almacenada en la incubadora con control de CO, y a 37°C.

Recuperación del Ovocito

El propósito de este procedimiento es de reunir cuantos más ovocitos sean posibles y de minimizar la exposición de los ovocitos a condiciones no fisiológicas.

Fluctuaciones rápidas en la temperatura y el pH pueden causar efectos deletéreos en la habilidad del ovocito para fertilizarse normalmente y seguir el desarrollo normal de la pre-implantación, llevándolo a menudo a la fragmentación.

- El Día 0 es el día de la recuperación de ovocito.
- Presión alta o no controlada puede dañar el ovocito.
- Para impedir que el pH disminuya durante la aspiración, los ovocitos deberán ser mantenidos en medio tampón HEPES como SynVitro®Flush o Flushing Medium.
- Para permitir que durante el procedimiento de lavado se produzca una baja en la temperatura, el medio deberá ser mantenido levemente por arriba de los 37°C usando bloques térmicos.
- Trabajar rápido y eficientemente.
- Los ovocitos deberán ser transferidos dentro de un medio de cultivo pre-equilibrado en una incubadora lo antes posible.

Evaluación de la calidad del ovocito

1) Inmaduro (I)
- Pequeño, compacto, gris, cumulus no expandido
- Células de Corona formando un anillo oscuro alrededor de la zona pelúcida.
- Ovocito apenas visible.

2A) Maduro (M)
- Cumulus expandido, pequeño.
- Corona no irradiada completamente.
- Ovocito parcialmente visible.

2B) Maduro y excelente (M)
- Cumulus grande y expandido
- Corona irradiada
- Ovocito claro y visible

3A) Sobre maduro (O)
- Cumulus pequeño y fino con pequeños parches de células oscuras.
- Se podrá observar un ovocito visible usualmente oscuro.

3B) Post maduro y atrético (O)
- Pequeños cumulus o totalmente
- Ovocito oscuro

Etapas de maduración del ovocito (ICSI)

GV (Vesícula germinal)
- Ovocito inmaduro
- Vesícula grande y redonda (núcleo)
- Nucleolo grande dentro de la vesícula germinal (núcleo)

MI
- ovocito inmaduro
- ningún cuerpo polar en el espacio perivitelino (PVS)

MII
- ovocito maduro
- cuerpo polar presente en el PVS

SynVitro®Flush (N. Cat. 1584 y 1576) es un medio de lavado puramente sintético diseñado para ser utilizado *in vivo*. El medio es utilizado para lavar los folículos, pero también para aclarar el lumen de la aguja de recuperación, las líneas de aspiración y para lavar/manejar los ovocitos hasta transferirlos en medios de cultivo pre-equilibrados dentro de la incubadora.

SynVitro®Flush es un medio modificado EBSS con SSR®, con tampón bicarbonato y HEPES para mejorar la estabilidad del pH en el aire. La formula químicamente definida exhibe excelentes propiedades de manejo y no contiene albúmina u otros componentes de origen biológico. El medio es listo-para-ser-utilizado, con o sin Heparina. La Heparina reduce la coagulación de aspirados foliculares conteniendo sangre.

SynVitro®Flush no contiene antibióticos y es por eso que recomendamos que este producto sea utilizado dentro de las 24 horas de ser abierto.

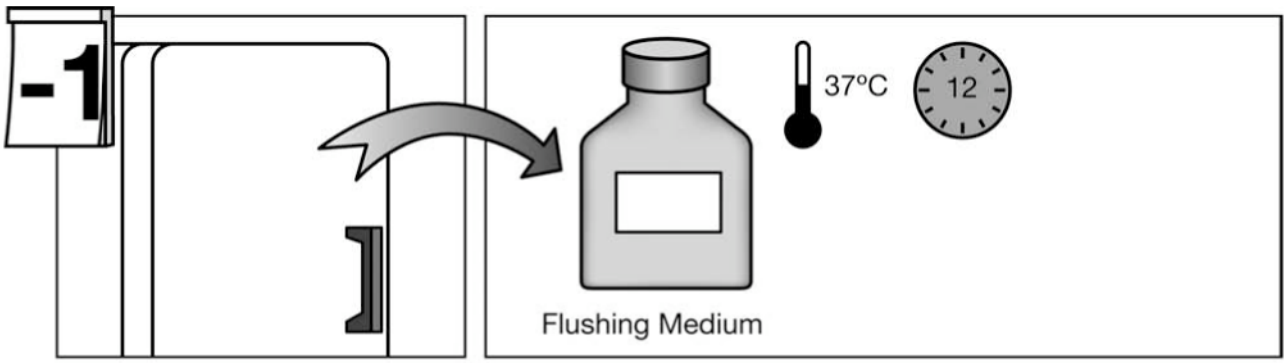
Flushing Medium (N. Cat 1084 y 1076)
El medio es un medio modificado EBSS con SSR® y HSA, tamponado con bicarbonato y HEPES para mejorar la estabilidad del pH en el aire. El medio es listo-para ser-utilizado, disponible con o sin Heparina. Heparina reduce la coagulación de los aspirados foliculares que contienen la sangre. Flushing Medium se encuentra solo disponible con Rojo Fenol y antibióticos.

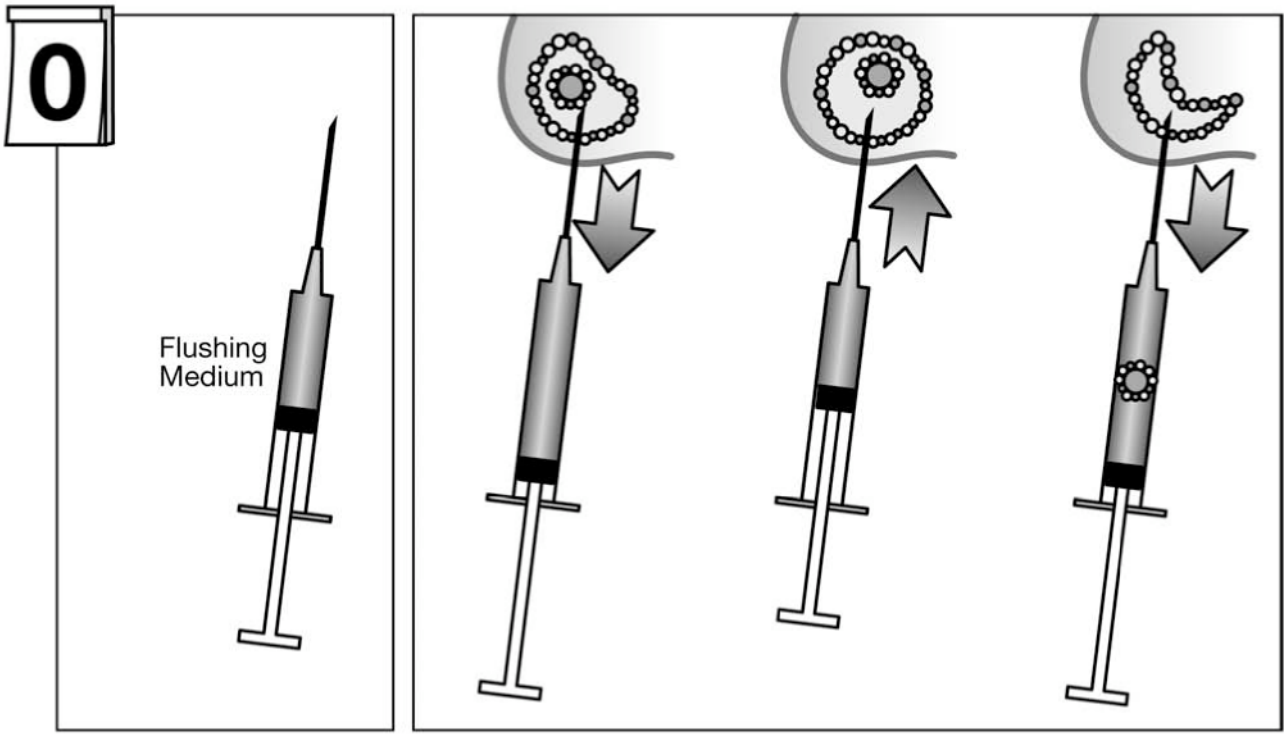
Manejo

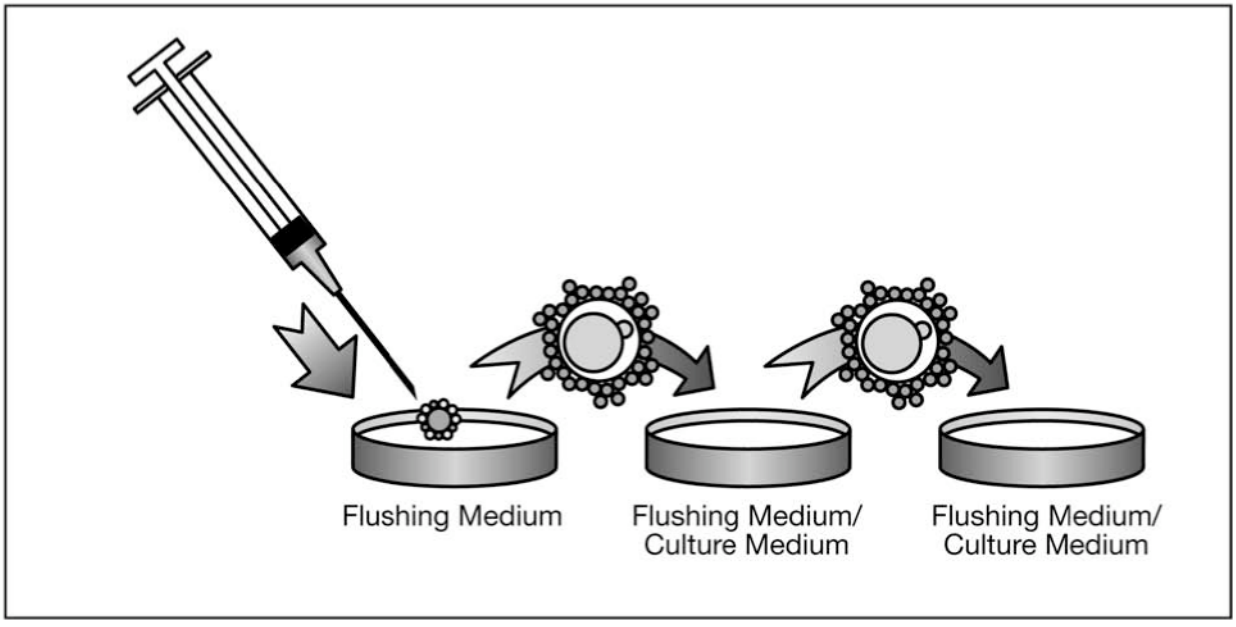
SynVitro®Flush y Flushing Medium son estables de pH para uso fuera de la incubadora sin previo equilibrio. Entibiar a 37°C previamente al uso.

Nota! La tapa de la botella debe ser cerrada fuertemente durante el pre-calentamiento.

Rápida Referencia
Flushing Medium



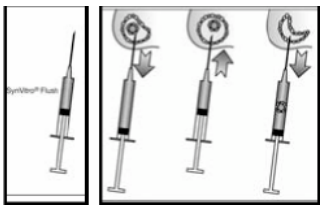




Instrucciones de uso (Recuperación de ovocitos):

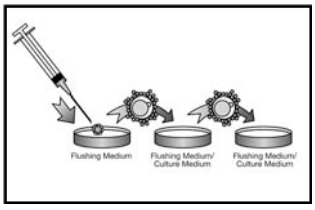
1. Durante el proceso entero de la recuperación de los ovocitos y el transporte al laboratorio de embriología, SynVitro®Flush o Flushing Medium deberán ser preservados a 37°C para evitar interrupción en el eje de los ovocitos.

2. Lavar la cavidad interna de la aguja de recuperación y la tubuladura de aspiración con 10 ml de SynVitro®Flush o Flushing Medium antes de comenzar la recuperación del ovocito.



3. Las jeringas utilizadas para la recuperación de los ovocitos deberán ser cargadas con SynVitro®Flush o Flushing Medium. Aspirar el fluido folicular y lavar el folículo cuando sea necesario con un volumen del medio equivalente a la cantidad de fluido folicular recolectado. Se deberá tener cuidado de no expandir el folículo con el medio por encima de su tamaño original.

4. El fluido folicular aspirado es preservado a 37°C utilizando platinas térmicas y deberá ser examinado por el laboratorio cuanto antes posible.



5. Los ovocitos son lavados con SynVitro®Flush / Flushing Medium o un medio de cultivo pre-equilibrado, teniendo sumo cuidado al remover los coágulos de sangre y las células de granulosa.

6. El número de ovocitos es contabilizado y su calidad es determinada.

7. Los ovocitos son transferidos a un medio de cultivos pre-equilibrado y almacenado en un incubador con control de CO, y a 37°C para aguardar la inseminación.

Alternativamente los ovocitos pueden ser almacenados en un sistema cerrado conteniendo SynVitro®Flush o Flushing Medium a 37°C hasta por 4 horas hasta la inseminación. El almacenamiento en SynVitro®Flush / Flushing Medium es utilizado principalmente en caso en el que los ovocitos sean transportados a otra clínica para cultivos e inseminación.

INSEMINACION

Dependiendo en la calidad del semen, la inseminación es llevada a cabo tanto por FIV como por ICSI en orden de proveer cuantos más ovocitos fertilizados sea posible.

Los procedimientos ICSI son descriptos en la sección "MICROMANIPULACION".

- La inseminación es llevada a cabo dentro de las 4 horas posteriores a la recuperación del ovocito.
- Para la inseminación FIV, el número de los espermatozoides agregados en cada ovocito depende en la historia de cada paciente y la practica del laboratorio. Generalmente aproximadamente 100.000 espermatozoides móviles por ml son utilizados.
- El tiempo de la inseminación varia entre 1 a 20 horas y depende en las prácticas del laboratorio y la calidad del esperma.

Procedimiento

1. La muestra de esperma preparada es contabilizada exactamente y deberá tener una concentración cercana a los 10 millones de espermatozoides móviles por ml. Esto se llevará a cabo en orden de minimizar el volumen de espermatozoides agregados a las cavidades de inseminación/ gotas.
2. El volumen de espermatozoides agregados será calculado para que la concentración final de espermatozoides en cada cavidad de inseminación/ gotas sea la adecuada (100.000 espermatozoide/ml).
3. Una vez que el espermatozoide ha sido agregado al plato de inseminación es chequeado bajo un microscopio para asegurarse de que el espermatozoide móvil este presente. El recipiente es luego retornado a la incubadora.
4. Luego de un corto período de inseminación (1 a 4 horas) los ovocitos son lavados en el medio de cultivo y son transferidos a un plato de cultivo. Las células de cumulus no deberán ser removidas en esta etapa.
5. Para incubación nocturna los ovocitos son dejados en el plato de inseminación por 16 a 20 horas.

Todos los medios de cultivos MediCult contienen suficiente concentración de glucosa necesaria para lograr tasas de fertilización óptimas y es por eso que pueden ser utilizados como medio de inseminación.

Dependiendo de la inseminación utilizada el sistema de cultivo utilizado será el Universal IVF Medium (N. Cat. 1030/1031), BlastAssist®Medium 1 (N. Cat. 1 039/1040) o ISM1™ (N. Cat. 1050/1150).

Evaluación de la Fertilización (Día 1)

La fertilización debe ser controlada en la primera hora de la mañana, antes de llevar a cabo alguna otra tarea. Es de extrema importancia evaluar si los ovocitos han sido fertilizados normalmente dado que de lo contrario los ovocitos anormales (1PN~ 3PN) pueden dividirse en la etapa embrionaria.

〈 Ser conscientes que la temperatura y el pH del medio de cultivo son inestables en el aire.

- trabajar rápido y eficientemente!

• Mantener el recipiente de inseminación bajo el flujo laminar con control de temperatura previo a la evaluación.

〈 La evaluación de la fertilización examina un número dinámico de parámetros y es por eso que deberá ser tomado en consideración que la morfología puede que cambie en un corto periodo de tiempo.

Procedimiento

1. Colocar los recipientes con los ovocitos inseminados y el recipiente del cultivo bajo el flujo laminar con control de temperatura.
2. Evaluar el número de pro núcleos, cuerpos polares, nucleolos y la morfología general. El puntaje mas alto se caracterizara por:
   - 〈 pronúcleos localizados en el centro del ovocito.
   - 〈 dos pronúcleos polarizados de igual tamaño.
   - 〈 nucleolos dentro del pronúcleo
   - 〈 el nucleolo polariza contra otros pronúcleos
   - 〈 aureola de la mitocondria (dos zonas dentro del citoplasma)
   - 〈 Membranas citoplasmáticas distinguidas
   - 〈 zona pelúcida intacta

   Solo ovocitos 2PN podrán ser contados como fertilizados normalmente. Todos los ovocitos 1PN podrán ser cultivados y re evaluados mas tarde en ese mismo día.
3. Lavar todos los presuntos embriones con dos pronúcleos (2PN) - y transferirlos al plato de cultivo.

Dependiendo del día en el que se espera hacer la transferencia, los embriones son cultivados en el Medio Universal IVF (N. Cat. 1030/1031), BlastAssist®Medium 1 (N. Cat. 1039/1040) o ISM1™ (N. Cat. 1050/1150).

MEDIO DE CULTIVO

Los ovocitos y los embriones son cultivados en un medio que provee condiciones físicos y químicas imitando el ambiente *in vivo*. Mientras que el embrión se va desarrollando su dependencia en el ambiente del medio aumenta y es por eso que se recomienda un sistema de medio de cultivo secuencial.

Los embriones pueden ser transferidos al útero en el Día 2 (40-48 horas posteriores a la inseminación), Día 3 (66-74 horas posteriores a la inseminación) o en la etapa del blastocisto en el Día 5-6 (120-144 horas posteriores a la inseminación).

Como elegir el medio de cultivo

MediCult ofrece 3 sistemas de cultivo diferentes:

1. **Universal IVF Medium**
   Un medio de selección temprana del embrión es diseñado para fertilización y cultivo de embriones en la etapa de clivage.
2. **ISM1™ & ISM2™**
   ISM1™ para fertilización y cultivos óptimos de embriones en la etapa de clivage hasta el día 3.
   ISM2™ para cultivo de blasticistos luego de la selección de embriones en ISM1™.
3. **BlastAssist®System** para cultivos dedicado a blastocistos.

Porque hay 3 sistemas de cultivo diferentes?

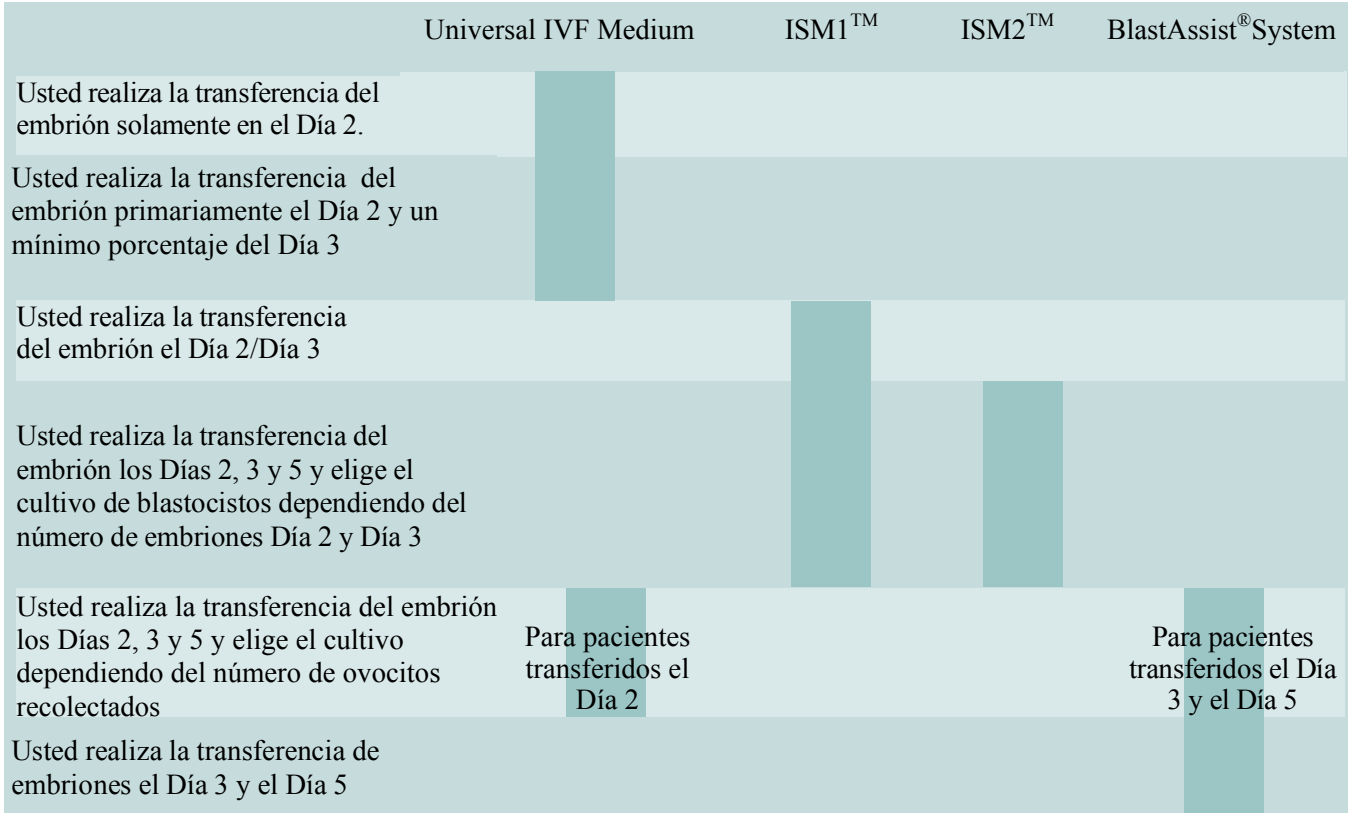
La selección de embriones para transferencia sigue aun basándose en el desarrollo del embrión y su morfología.

El desarrollo de los embriones esta influenciado tanto positiva como negativamente por los mismos componentes del ambiente. El efecto depende de ambas concentraciones y etapas del desarrollo del embrión.

Las composiciones del medio tienen fuertes influencias en el desarrollo del embrión y su morfología, ofreciendo diferentes posibilidades para la selección del embrión en las diferentes etapas del desarrollo.

Las condiciones óptimas del cultivo dependen por eso de las rutinas del laboratorio.

¿Cómo elegir un medio de cultivo?


Universal IVF Medium
ISM1™
ISM2™
BlastAssist®System
Usted realiza la transferencia del embrión solamente en el Día 2.
Usted realiza la transferencia del embrión primariamente el Día 2 y un mínimo porcentaje del Día 3
Usted realiza la transferencia del embrión el Día 2/Día 3
Usted realiza la transferencia del embrión los Días 2, 3 y 5 y elige el cultivo de blastocistos dependiendo del número de embriones Día 2 y Día 3
Usted realiza la transferencia del embrión los Días 2, 3 y 5 y elige el cultivo dependiendo del número de ovocitos recolectados
Para pacientes transferidos el Día 2
Para pacientes transferidos el Día 3 y el Día 5
Usted realiza la transferencia de embriones el Día 3 y el Día 5

Universal IVF Medium (N. Cat. 1030, 1031 y 1095) ha sido diseñado especialmente para cumplir con los requerimientos de los embriones más tempranos. El medio es utilizado para el procedimiento de inseminación FIV, para cultivos hasta embriones de 2-8 células y para transferencia de embrionaria.

Universal IVF Medium es un modificado EBSS con SSR® y HSA. Las fuentes del nutriente son glucosa, que ayuda a la capacitación del esperma durante los procedimientos FIV, y piruvato de sodio para el temprano desarrollo del embrión. El medio tiene un tampón de bicarbonato de sodio fisiológico. Fuera de la incubadora el pH del medio va a incrementar. El medio esta disponible con o sin Rojo Fenol. *La versión con Rojo Fenol esta disponible con o sin los antibióticos.\ (Penicilina / Estreptomicina).*

ISM1™, ISM2™ y UTM™ (N. Cat. 1050/1150, 1051/1151 y 1052/1152) es un sistema secuencial de medio diseñado para cumplir con todos los requerimientos de los embriones en todas las etapas del desarrollo. ISM1™ puede ser utilizado tanto por el procedimiento de inseminación FIV como por el cultivo del embrión hasta el Día 3. ISM2™ es para el cultivo de embriones desde el Día 3 hasta la etapa de blastocisto. UTM™ esta diseñado especialmente para transferir al embrión cultivado en ISM1™ e ISM2™. Prof. Y. Ménézo ha diseñado el medio de cultivo compuesto con HSA y vitaminas para minimizar el estrés oxidativo. Las fuentes de los nutrientes son glucosa, que ayuda a la capacitación del esperma durante los procedimientos IVF, piruvato de sodio para el desarrollo temprano del embrión y glucosa, piruvato de sodio/ lactato de calcio para el desarrollo del blastocisto. El medio incluye un tampón de bicarbonato de sodio fisiológico. Fuera de la incubadora el pH del medio incrementará. El medio se encuentra disponible con o sin Rojo Fenol.

BlastAssist®System (N. Cat. 1039 y 1040) es un sistema secuencial de medio de cultivo diseñado para cumplir con todos los requerimientos del embrión en cada etapa del desarrollo. BlastAssist®Medium 1 es utilizado para el proceso de inseminación FIV y el cultivo previo a las etapas celulares 4-6. BlastAssist®Medium 2 es utilizado para el cultivo de embriones a partir del día 2 y hasta la etapa de blastocistos, y para transferir los embriones cultivados utilizando el BlastAssist® System.

Prof. Kjell Bertheussen ha diseñado las composiciones del medio con SSR® y HSA. Las fuentes del nutriente son glucosa, que ayuda a la capacitación del esperma durante los procedimientos FIV, y el piruvato de sodio para el temprano desarrollo del embrión. El medio incluye un sistema tampón de bicarbonato de sodio fisiológico. Fuera de la incubadora el pH del medio va a incrementar. El medio esta disponible con o sin Rojo Fenol.

Manejo

Previo al uso, equilibrar el medio de cultivo en el recipiente del cultivo por un mínimo de 2 horas en una incubadora con control de CO_2 y a 37°C.

Cultivo de Embriones

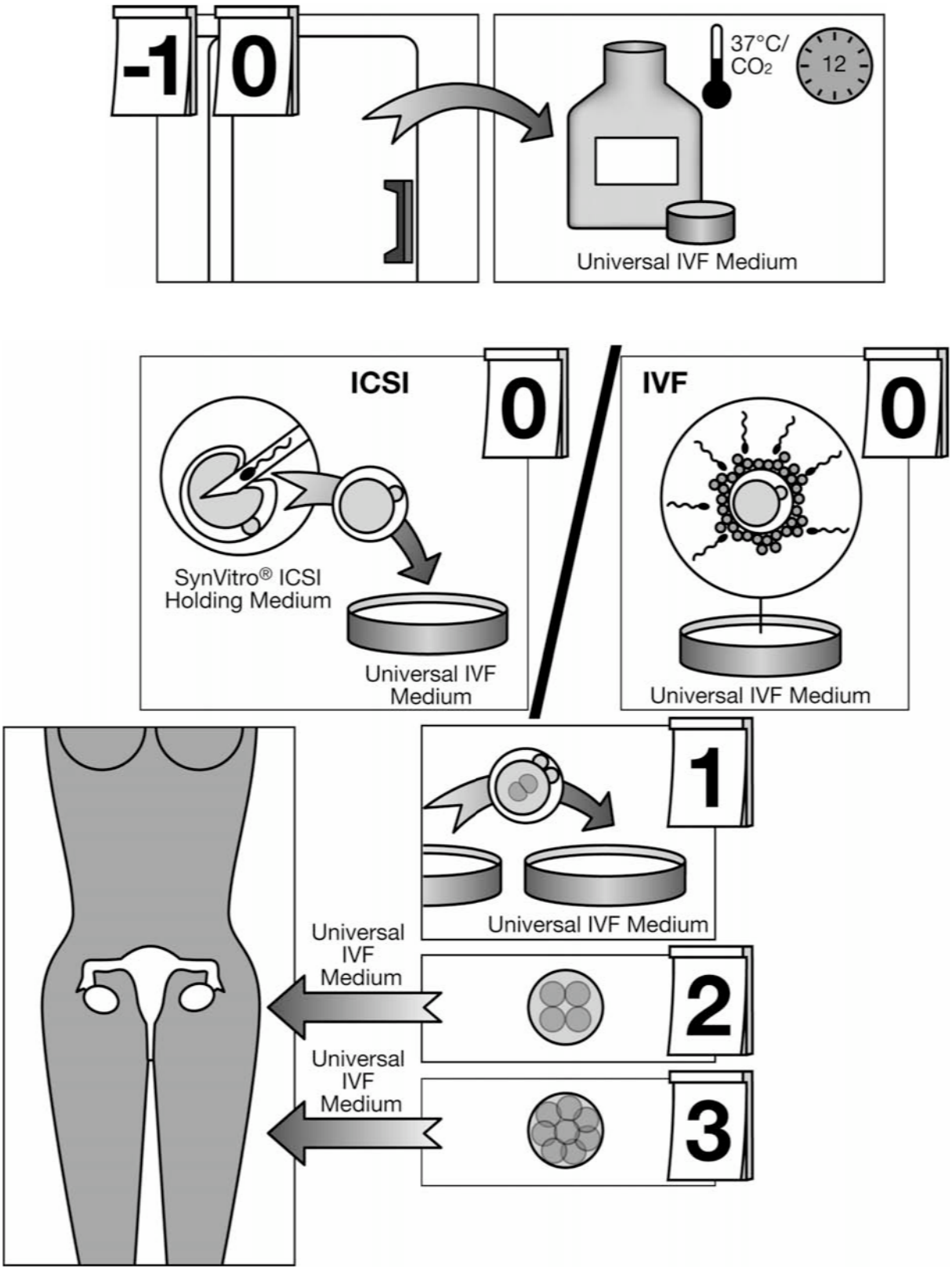
- ⊙Embriones de desarrollo rápido tendrán mayor potencial de implantación.
- ⊙Los embriones deberán ser evaluados una vez al día, preferiblemente en tiempos fijados para que la tasa de crecimiento se note.
- ⊙El cultivo de blastocistos no mejora la calidad pobre del embrión en el Día 2 y el Día 3, pero mejora la selección del embrión para transferencia – especialmente beneficiosa en caso de transferencia de un único embrión.
- ⊙Embriones cultivados hasta el Día 5 deberán ser evaluados en la mañana.
- ⊙Ser conscientes que la temperatura y el pH del medio de cultivo son inestables en el aire.
  Trabajar rápido y eficientemente cuando se traslade el embrión fuera de la incubadora!
- ⊙Manejo adecuado de la incubadora es importante para asegurar el re-equilibrado del medio de cultivo.
- 〈 Cultivos bajo Parafina Liquida retrazan la perdida de temperatura y el cambio del pH en comparación con cultivos de platos abiertos. Ser conscientes que mientras que la Parafina Líquida va a disminuir la velocidad de los tiempos de salida del gas del medio también retardará la velocidad del reingreso del gas.

Liquid Parafin (N. Cat. 1010) es utilizada como una capa aceitosa para medios de cultivo durante procedimientos FIV e ICSI. Además de ser evaluada con el Hybritest™ y ser materia prima altamente refinada, MediCult Parafina Líquida es pre-lavada utilizando Universal IVF Medium. El balance de sales inorgánicas y albúmina de suero humano (HSA) en los procedimientos de lavado ayuda a la HSA a enlazar potenciales componentes tóxicos para el embrión y saturar el aceite de la parafina con lípidos esenciales para el embrión. La Parafina Líquida entonces no agotará los lípidos vitales presentes el medio cuando sea utilizada en cultivos del laboratorio FIV. MediCult Parafina Líquida tiene el nivel mas bajo de endotoxinas ~ 0.1 EU/ml.

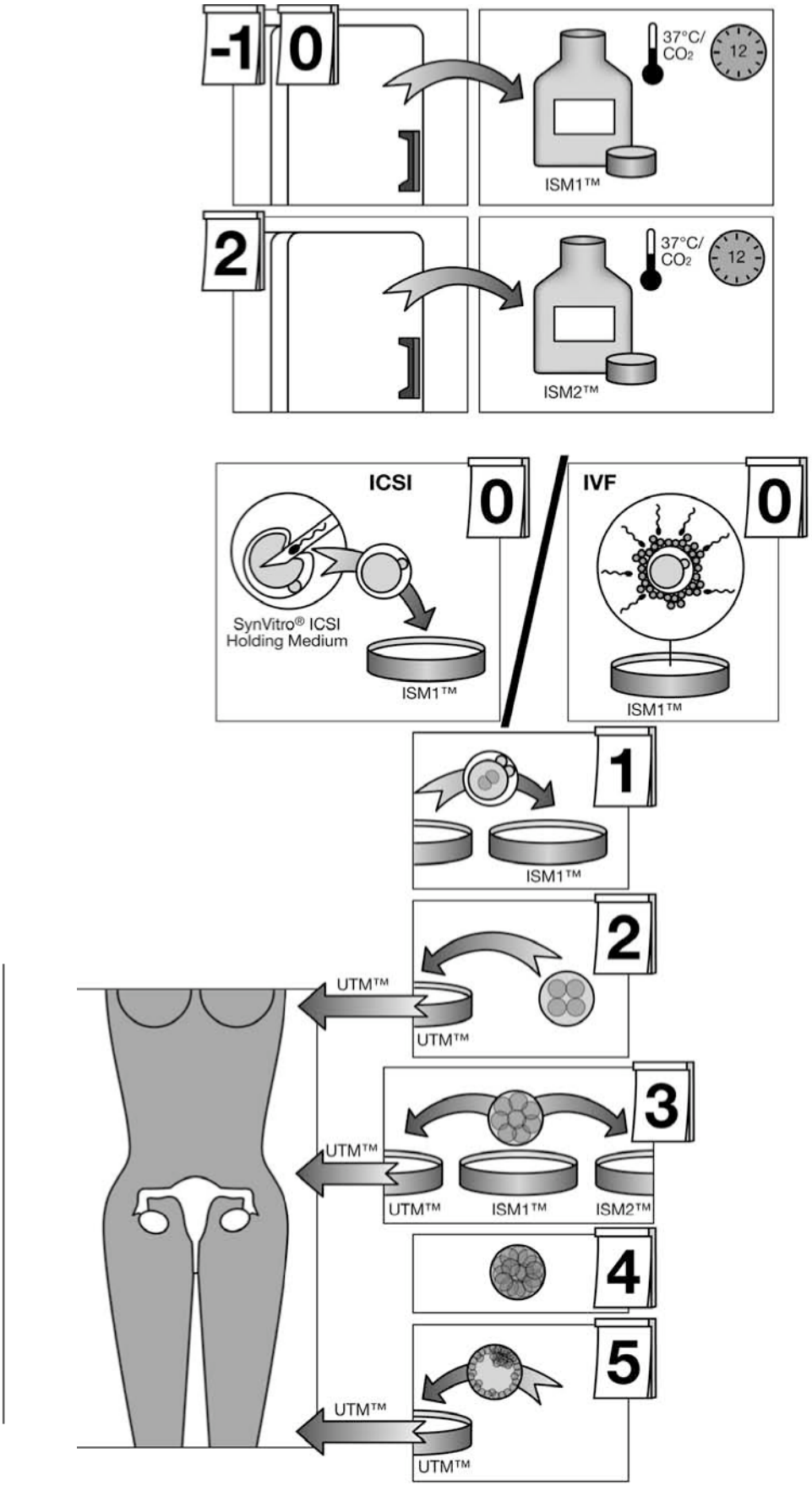
Manejo

Previo al uso, equilibrar la Parafina Liquida en CO, a 37°C por un mínimo de 12 horas.

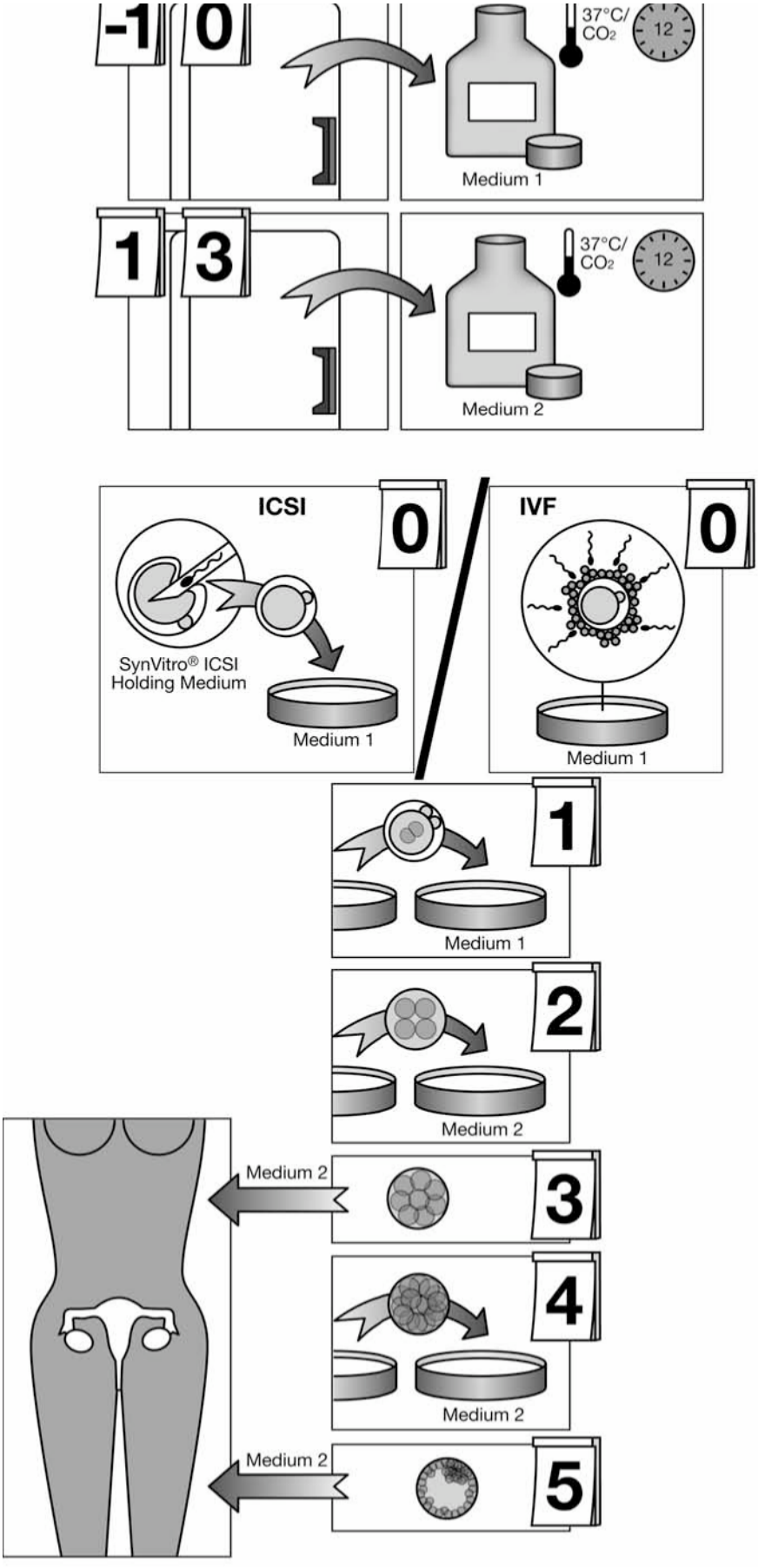
Rápida Referencia
Universal IVF Medium



Rápida Referencia
ISM™



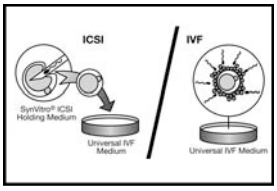
Rápida Referencia
BlastAssist®System



Transferencia de embriones de Día 2

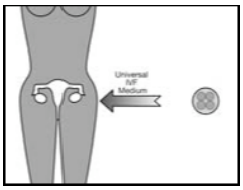
El cultivo es realizado en ambos: Universal IVF Medium o ISM1™.

Instrucciones de uso A.1 (Universal IVF Medium):



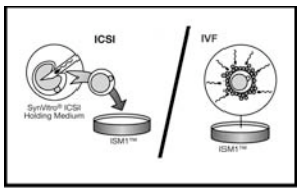
1. Llevar a cabo la inseminación (Día 0) en Universal IVF Medium pre-equilibrado. Donde el ICSI es requerido, los ovocitos serán transferidos al Universal IVF Medium inmediatamente luego de la inyección.

2. A las 16-20 horas (Día 1), chequear la formación de pronúcleos y transferir los pre-cigotos a un plato de cultivo pre-equilibrado conteniendo 50 µl microgotas o 0.5 ml cavidad/plato del Universal IVF Medium para futuros cultivos.
El embrión deberá ser cultivado únicamente o de manera múltiple con un máximo de 4 por cavidad.



3. Los embriones son preparados y transferidos al útero en Universal IVF Medium en el Día 2 cuando hayan alcanzado la etapa celular 4-5. Revisar la sección "TRANSFERENCIA EMBRIONARIA (ET)".

Instrucciones de uso B.1 (ISM1™):

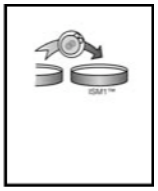


1. Llevar a cabo la inseminación (Día 0) en ISM 1™ pre-equilibrado o Universal IVF Medium (N. Cat. 1030/1031). Donde ICSI es requerido la inseminación es llevada a cabo en un SynVitro®ICSI Holding Medium pre-tibio (N. Cat 1585).

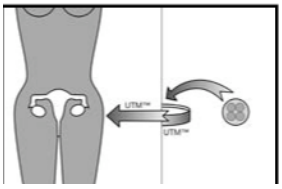
2.

a) Si Universal IVF Medium es el medio de inseminación para FIV, se recomienda un temprano enjuague en ISM1™ a las 4 horas para obtener una mejor morfología en el embrión. Una vez que los ovocitos son cuidadosamente transferidos a un plato de cultivo pre-equilibrado conteniendo 50 µl microgotas o 0.5 ml cavidades/plato de ISM1™ cubiertos con Parafina Liquida (N. Cat. 1010).

b) Donde ICSI sea requerido, los ovocitos serán transferidos al plato de cultivo pre-equilibrado de ISM1™ inmediatamente luego de la inyección.
Los embriones deberán ser cultivados únicamente o de manera múltiple con un máximo de 4 por cavidad.



3. A las 16-20 horas (Día 1), chequear la formación de pronúcleos, luego cuidadosamente lavar y transferir pre-cigotos a microgotas de 50 µl o 0.5 ml cavidad/recipiente de ISM1™ cubierta con Parafina Liquida.
Los embriones deberán ser cultivados únicamente o de manera múltiple con un máximo de 4 por cavidad.



4. Al Día 2 cuando los embriones hayan alcanzado 4-5 células son colocados en medio UTM™ (Uterine Transfer Medium) pre-equilibrado a la espera de la transferencia. Revisar la sección "TRANSFERENCIA EMBRIONARIA (ET)"

Evaluación del embrión en el Día 2

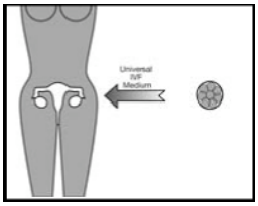
A las 40-48 horas posteriores a la inseminación los embriones deberán ser evaluados para su transferencia, cultivo extendido o criopreservacion. El puntaje más alto se caracterizará por:

- 4-5 blastómeros (clivage antes que apariencia),
- blastómeros de tamaños iguales con citoplasmas homogéneos y membranas plasmáticas distinguibles así como núcleos en uno de los blastómeros,
- células no multinucleares,
- 4 etapas celulares con un "x" (alineación simétrica)
- ningún fragmento o un máximo de 10 % de fragmentos
- los blastómeros “llenan” la zona,
- zona normal, pero desigual.

Día 3 de la transferencia de los embriones

Dependiendo del medio de cultivo elegido en el Día 0/ Día 1, el cultivo es llevado a cabo con Universal IVF Medium, ISM1™ o BlastAssist®Medium 2.

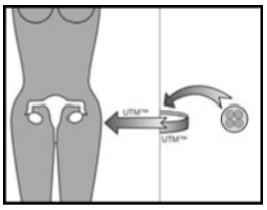
Instrucciones de uso A.2 (Embriones cultivados en Universal IVF Medium desde el día 0):



Paso 1-2 como en el procedimiento A1
El embrión puede ser mantenido en el mismo medio desde el Día 1 hasta el Día 3, y es por eso que no se necesitarán cambios extras en el medio en comparación con la transferencia del Día 2. Ver procedimiento A. 1.

3. Los embriones son preparados y transferidos al útero en Universal IVF Medium en el Día 3, cuando hayan alcanzado la etapa de 6-8 células. Ver la sección "TRANSFERCIA EMBRIONARIA (ET)".

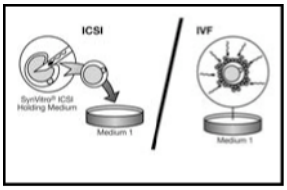
Instrucciones de uso B.2 (Embriones cultivados en ISM1™ desde el Día 0):



Pasos 1-3 como en el procedimiento B1
Los embriones pueden ser mantenidos en el mismo medio desde el Día 1 hasta el Día 3, y es por eso que no son necesarios cambios extra en el medio en comparación con la transferencia del Día 2. Ver procedimiento B.1.

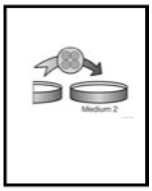
4. En el Día 3 cuando los embriones han alcanzado la etapa de 6-8 células son colocados en medio UTM™ pre-equilibrado (Uterine Transfer Medium) en la espera de la transferencia. Ver la sección "TRANSFERENCIA EMBRIONARIA (ET)".

Instrucciones de uso C.1 (BlastAssist®System):

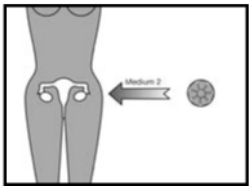


1. Llevar a cabo la inseminación (Día 1) en Medium 1 o Universal IVF Medium (N. Cat.. 1030/1031) pre-equilibrado. Donde ICSI es requerido, los ovocitos son transferidos al Medium 1 inmediatamente luego de la inyección.

2. A las 16-20 horas (Día 1), chequear pronúcleos, luego lavar y transferir cuidadosamente los pre-cigotos a un plato de cultivo pre-equilibrado conteniendo microgotas de 50 µl o cavidad/plato con 0.5 ml del Medium 1 para futuro cultivo. *El embrión deberá ser cultivado únicamente o de manera múltiple a un máximo de 2 por cavidad.*



3. En la etapa de 5-6 células, los embriones son lavados en un Medium 2 pre-equilibrado y transferidos a microgotas de 50 µl o cavidades/plato con 0.5 ml del mismo medio.
Los embriones deberán ser cultivados únicamente o en forma múltiple con un máximo de 4 por cavidad en la segunda etapa del medio.



4. Los embriones son preparados y transferidos al útero en Medium 2 cuando hayan alcanzado la etapa de 6-8 células en el día 3. Ver la sección "TRANSFERENCIA EMBRIONARIA (ET)".

Evaluación del embrión en el Día 3

A las 66-74 horas posteriores a la inseminación los embriones deberán ser evaluados para la transferencia, los cultivos extendidos (hasta el día 5 o el 6) o la criopreservación. El puntaje más alto se caracterizará por:

- 6-8 blastómeros (clivage antes que apariencia),
- blastómeros de tamaños iguales con citoplasmas homogéneos y membranas plasmáticas distinguibles así como núcleos en uno de los blastómeros,
- ninguna célula multinuclear,
- homogeneidad, embrión compactado,
- ningún fragmento o un máximo de 10 % de fragmentos,
- blastómeros “llenan” la zona,
- zona normal, pero desigual.

Cultivo extendido (Día 5-6)

Dependiendo del medio de cultivo elegido en el Día 0/Día 1, el cultivo es practicado en ISM2™ o BlastAssist® Medium 2.

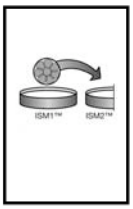
〈 La transferencia de blastocistos puede incrementar las tasas de embarazos e implantaciones.

〈 Cultivo de blastocistos y criopreservación requieren un control riguroso de las condiciones del laboratorio.

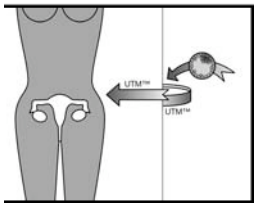
〈 El cultivo extendido puede que necesite cambios en las tareas y equipos de uso.

Instrucciones de uso B.3 (Embriones cultivados en ISM1™):

Paso 1-3 como en las instrucciones de uso B.1



4. En el Día 3, los embriones son lavados con cuidado en ISM2™ pre-equilibrado y son transferidos a 50 µl microgotas frescas o 0,50 ml cavidad/plato del mismo medio. *Los embriones deberán ser cultivados independientemente o de forma múltiple hasta un máximo de 4 por cavidad en la segunda etapa del medio, hasta la formación de los blastocisto en el Día 5 aproximadamente.*



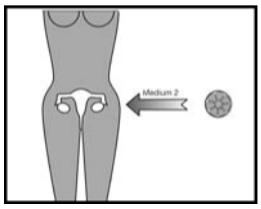
5. En el Día 5 cuando los embriones hayan alcanzado la etapa del blastocisto son puestos en medio UTM™ (Uterine Transfer Medium) pre-equilibrado a la espera de la transferencia. Ver la sección "TRANSFERENCIA EMBRIONARIA (ET)".

I

Instrucciones de uso C.2 (Embriones cultivados en BlastAssist®System):

Paso 1-3 como en las instrucciones de uso C.1.

4. En el Día 4, los embriones son transferidos cuidadosamente a 50 µl microgotas ó 0.5ml cavidad/ plato de Medium 2 fresco y pre-equilibrado.
Los embriones deberán ser cultivados individualmente o en forma múltiple con un máximo de 4 por cavidad.



5. Los embriones son preparados y transferidos al útero en Medium 2 cuando hayan alcanzado la etapa del blastocisto. Ver la sección "TRANSFERENCIA EMBRIONARIA (ET)".

Evaluación de embriones en el Día 4

96-100 horas posteriores a la inseminación, los embriones se han transformado en mórulas o blastocistos tempranos.

Evaluación del embrión en los Días 5-6

120-144 horas posteriores a la inseminación, los embriones deberán ser evaluados para la transferencia de embriones o la criopreservación. Blastocistos con un número alto de células y masa celular interna (ICM) bien definida deberán ser seleccionados para la transferencia. Generalmente, los blastocistos son formados durante los Días 4 y 5 y es por eso que para obtener resultados óptimos, los blastocistos deberán ser transferidos en el Día 5. Blastocistos formados en el Día 6 son demorados y es por eso que normalmente no son ni transferidos ni congelados.
La clasificación de blastocistos deberá ser llevado a cabo mientras se mantiene pH fisiológico y temperatura. La mayoría de los blastocistos deberán ser clasificados 4AA en el día 5. (Gardner DK & Schoolcraft WB, 1999. Towards Reproductive Certainty: Infertility y Genetics Beyond 1999. Eds. Jansen R. & Mortimer D., Parthenon Press, Carnforth, pp 378-388).

Consultar los sistemas de clasificación en la siguiente página.

<u>Clasificación inicial:</u> Clasificación numérica 1 a 6, basado en el grado de expansión, status hatching, masa celular interna y trofectodermo: Estas evaluaciones pueden ser llevadas a cabo en un microscopio de disección.

1. Blastocisto Temprano; blastocele < que la mitad del volumen del embrión.
2. Blastocisto; blastocele > que la mitad del embrión.
3. Blastocisto completo; blastocele ocupa completamente el embrión.
4. Blastocisto expandido; volumen del blastocele > que el del embrión temprano. La zona se esta afinando.
5. Blastocisto en hatching; el trofectodermo ha empezado a salirse de la zona pelúcida.
6. Blastocisto extruido; el blastocisto ha escapado completamente de la zona.

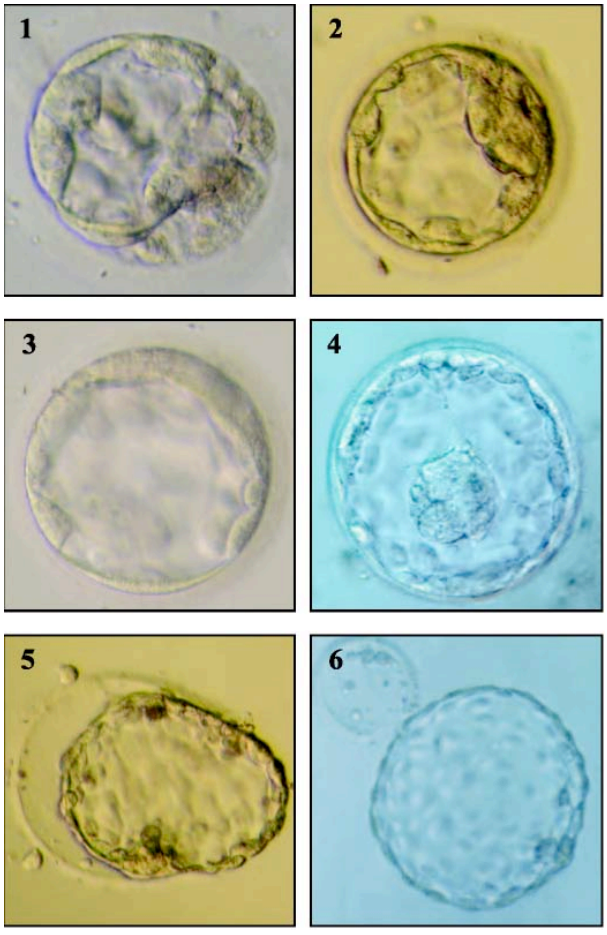
<u>Segunda etapa de la clasificación:</u> Para blastocistos graduados 3 a 6 (i.e. blastocistos completos en adelante) el desarrollo de la masa celular interna (ICM) y el trofectodermo es evaluado. Estas evaluaciones deberán ser llevadas a cabo en un microscopio invertido.

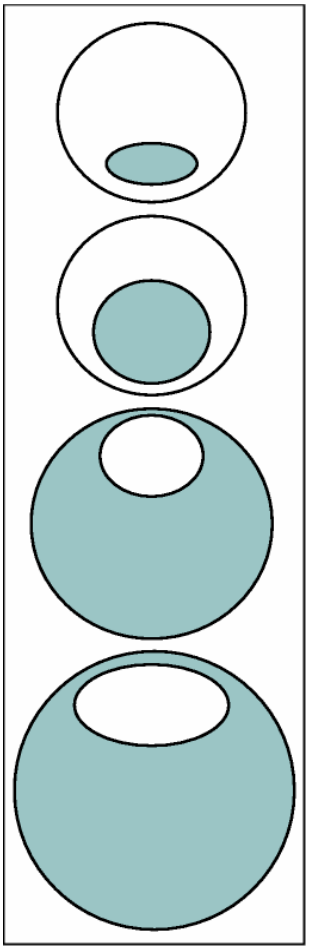
Clasificación del ICM

A. Fuertemente compacto, varias células
B. Agrupadas de manera floja, varias células
C. Muy pocas células

Clasificación del trofectodermo

A. Varias células formando un epitelio cohesivo
B. Pocas células formando un epitelio flojo
C. Muy pocas células





Imágenes de células proporcionadas por
Department of Obstetrics and Gynecology, University Medical Centre en Ljubljana Slovenia y el IVF Laboratory of The Reproductive Medicine Service, Department of Obstetrics y Gynecology, Institut Universitary. Dexeus, Barcelona, Spain.

Transferencia de Embriones (ET)

Deberá ser llevado a cabo con el más mínimo trauma posible tanto para el embrión (s) como para el paciente. El procedimiento es llevado a cabo en forma transcervical y a menudo sin anestesia.

- Utilizar un catéter suave, no tóxico y no traumático de uso único.
- Se deberá tener mucho cuidado para evitar que la punta del catéter se contamina en cualquier instante de la operación.
- El embrión (s) es cargado en el catéter de transferencia justo antes del procedimiento de transferencia.
- Se deberá prestar mucha atención para minimizar el trauma en la canal cervical y la cavidad uterina.

Procedimiento

Los embriones serán transferidos en el Transfer Medium (UTM™) especial o en el mismos medio que es utilizado en el cultivo. UTM™ contiene hialuron para facilitar la implantación del embrión humano.

El procedimiento actual de la transferencia depende de la experiencia en la clínica de fertilidad. Es de gran importancia que todo el staff implicado sienta comodidad con lo que se está realizando. Varios centros utilizan el siguiente procedimiento:

1. Una hora antes de lo panificado el ET, las jeringas y los catéteres son almacenados en la incubadora.
2. El doctor prepara a la paciente: higieniza la vagina, aplica un espéculo limpio y tibio y lava el orificio del útero con salina tibia y estéril.
3. Un catéter de ensayo será introducido para evaluar la comodidad del pasaje por el cervix y dentro del útero. Si el pasaje es sencillo, el embrión (s) podrá ser cargado dentro de un catéter limpio para el procedimiento ET.

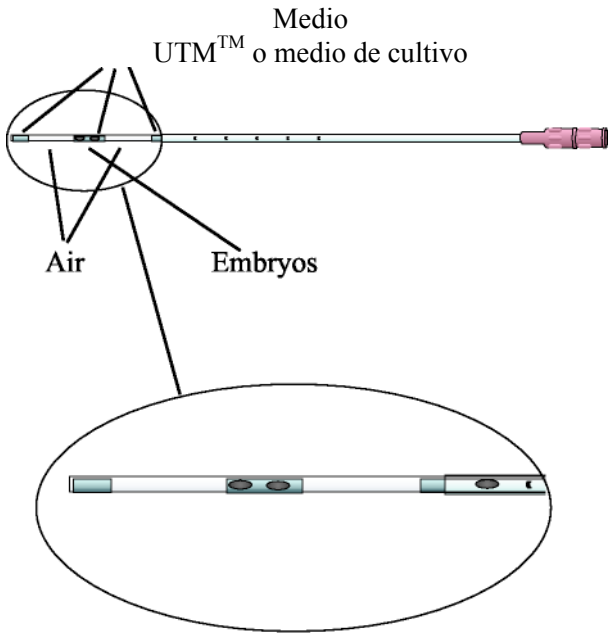
   El ET es llevado a cabo, posiblemente con la guía de ultrasonido y con vejiga llena.
4. Una jeringa de 1 ml no-toxico es enjuagada con UTM™ o un medio de cultivo y llenado con 0.5 ml del medio para la transferencia. No dejar aire en la jeringa y conectarla firmemente al catéter de transferencia.
5. Conectar firmemente la jeringa al catéter. Expulsar todo el medio menos 50 µl por el catéter.
6. Sacar el plato con el embrión del paciente, volver a chequear su identidad y asegurarse que los embriones estén en el plato y cerca uno del otro.

   Los embriones son mantenidos en el medio de transferencia.
7. Cargar el catéter:

   Primero aspirar cerca de 10-15 mm del aire dentro del catéter y luego medio seguido por los embriones y medio adicional. (10-15 mm en total).
   Chequear todos los movimientos por el microscopio.

   Finalmente aspirar lentamente cerca de 10-15 mm de aire y 5 mm del medio dentro de la punta del catéter (no deberán haber roturas allí de la columna del medio o formación de burbujas de aire).

   La última proporción del medio previene que muco cervical entre al catéter, ya que puede dificultar el ET (ver dibujo).



8. El catéter de transferencia es gentilmente insertado y el embrión es expulsado en 20-30 µl del medio.
9. Finalmente el catéter es retirado, lavado y examinado para asegurarse que los embriones sean liberados.

El ultrasonido puede ser utilizado para asegurarse la posición del útero previo a la transferencia y también puede ser utilizado luego de determinar la posición de los embriones. (en medio de las dos burbujas de aire)

MICROMANIPULACION

Introducción

Micromanipulación incluye los procedimientos de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), hatching asistido y biopsia de embriones.

- Todos los equipos de micromanipulación deberán ser posicionados correctamente para lograr una máxima estabilidad. Las vibraciones (puertas, ascensores, tráfico, etc.) deberán ser evitadas ya que estas pueden causar interrupciones estresantes.
- Para máximos resultados, utilizar solamente instrumentos de micromanipulación de la más alta calidad.
- El mantenimiento constante de la temperatura durante el procedimiento es importante. Por todo lo mencionado, es necesario el uso de platinas térmicas correctamente ajustadas (i.e. etapa de calentado del microscopio) para mantener el medio cerca de los 37°C.

  Luego de 5-10 minutos de micromanipulación, se puede esperar que la temperatura del medio sea de aproximadamente 5°C, más fría que la temperatura original de la platina térmica.
- Utilizar una capa de Parafina Líquida pre-equilibrada para retrazar la osmolaridad y los cambios en el pH.
- *Trabajar rápido y eficientemente!*

Denudación de ovocitos para ICSI

Este procedimiento implica la eliminación enzimática y mecánica de las células del cumulus que rodean el ovocito. La denudación es requerida para permitir la visualización del cuerpo polar para un correcto alineamiento del ovocito previo a la inyección de espermatozoide, y para asegurarse que el espermatozoide este correctamente inyectado.

- Los ovocitos son denudados 1-2 horas luego de la recuperación y el ICSI es llevado a cabo 1-2 horas luego de la eliminación del cumulus.
- Utilizar pipetas con un diámetro levemente mayor que el de los ovocitos y evitar el manejo excesivo.
- Luego de la recuperación de los ovocitos se recomienda dejarlos descansar con un mínimo de 2 horas previas a la denudación.

Recordar que los ovocitos son frágiles y pueden resultar susceptibles a la lisis sin son aspirados muy vigorosamente.

SynVitro®Hyadase (N. Cat. 1511) es listo-para-ser-utlizado y consiste de un medio básico puro sintético conteniendo 80 IU/ml de la enzima hialuronidasa. El material crudo de hialuronidasa es de origen ovino, con licencia para usos terapéuticos humanos.

Manejo

SynVitro®Hyadase tiene un tampón HEPES y pH estable para uso fuera de la incubadora sin previo equilibrado. Calentar a 37°C previo a su uso.

No exponer los ovocitos por mucho tiempo a la solución de hialuronidasa ya que esto puede activarlos partenogeneticamente y también puede afectar la habilidad de clivage del futuro embrión.

SynVitro®Cumulase™ (N.Cat 1512) es listo-para-ser-utilizado y consiste de un medio básico puramente sintético con 80 U/ml de enzima hialuronidasa. Esta hialuronidasa es un producto 100% recombinante humano (rHuPH20).

La hialuronidasa recombinante humana es producida en un sistema que no posee ningún derivado de producto animal. Esto permite la purificación de glicoproteina humana homogenea con una pureza 100 veces mayor que las preparaciones más comúnmente utilizadas. SynVitro®Cumulase™ es por eso la más segura para utilizar del mercado.

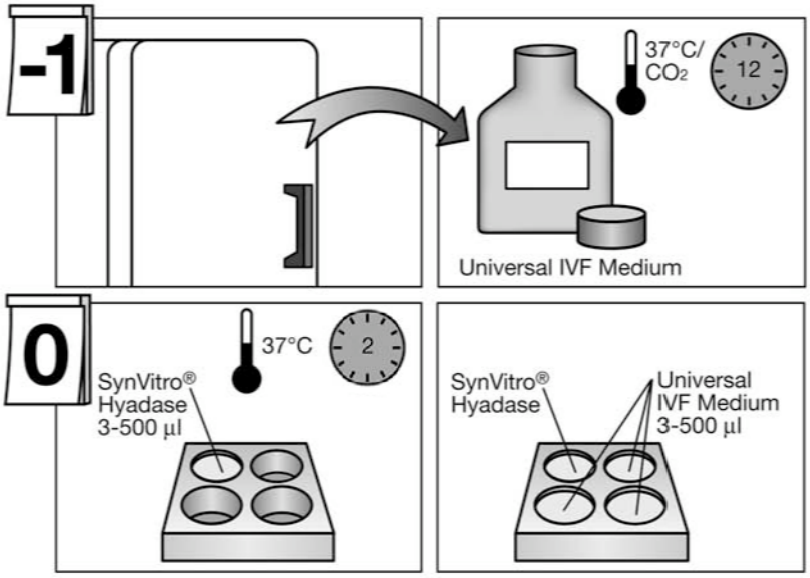
La enzima Cumulase™ ha demostrado que es segura y efectiva en la eliminación de las matrices del cumulus humano previa a la inyección intracitoplasmática de esperma

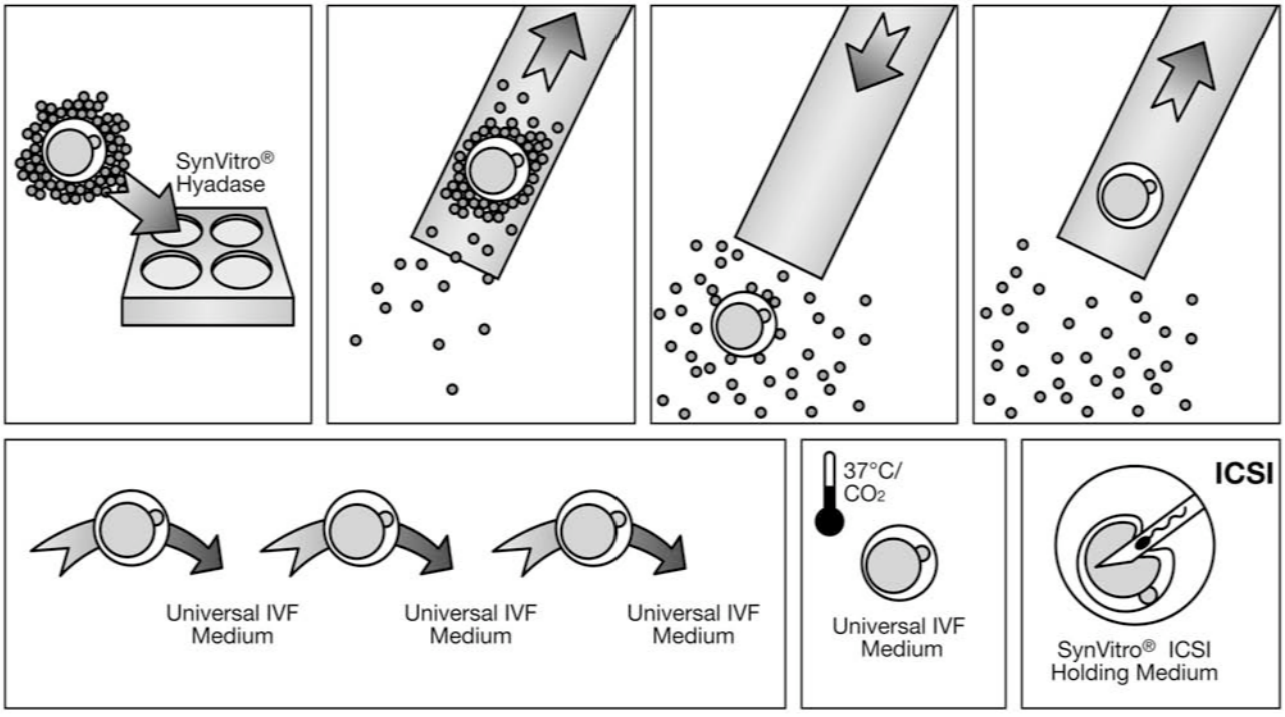
Manejo

SynVitro®Cumulase™ contiene un tampón HEPES y pH estable para uso fuera de la incubadora sin previa equilibración. Calentar a 37°C previo al uso.

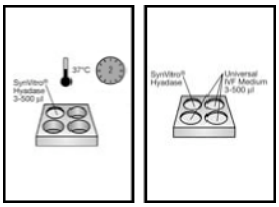
Una de las mayores ventajas en utilizar SynVitro®Cumulase™ es que el tiempo de exposición para los ovocitos a la hialuronidasa recombinante humano es mucho menos crítico, por lo tanto se elimina un factor estresante en el procedimiento ICSI.

Rápida Referencia
SynVitro®Hyadase (Sistema abierto)





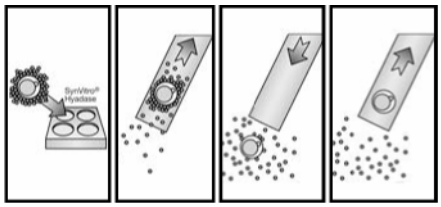
Instrucciones de uso (SynVitro®Hyadase):
Sistema abierto



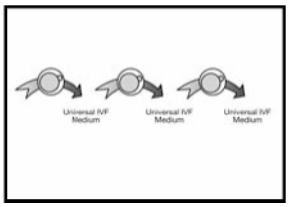
1. Preparar un plato de cuatro cavidades con una cavidad de SynVitro®Hyadase (3-5 00 µl) y las otras tres cavidades con Universal IVF Medium (3-500 µl) pre-equilibrado.

2. Humedecer el interior de una pipeta larga y pre-calentada con el medio del plato en el que los ovocitos son almacenados.

3. Reunir los ovocitos muy cerca unos de los otros con una pipeta para asegurarse de que sean fácilmente colocados dentro de la pipeta.



4. Colocar uno o varios complejos ovocitos cumulus en una cavidad con SynVitro®Hyadase. Luego de 5-10 segundos, suavemente aspirar los ovocitos arriba y abajo hasta que la mayoría de las células del cumulus hayan sido aflojadas.



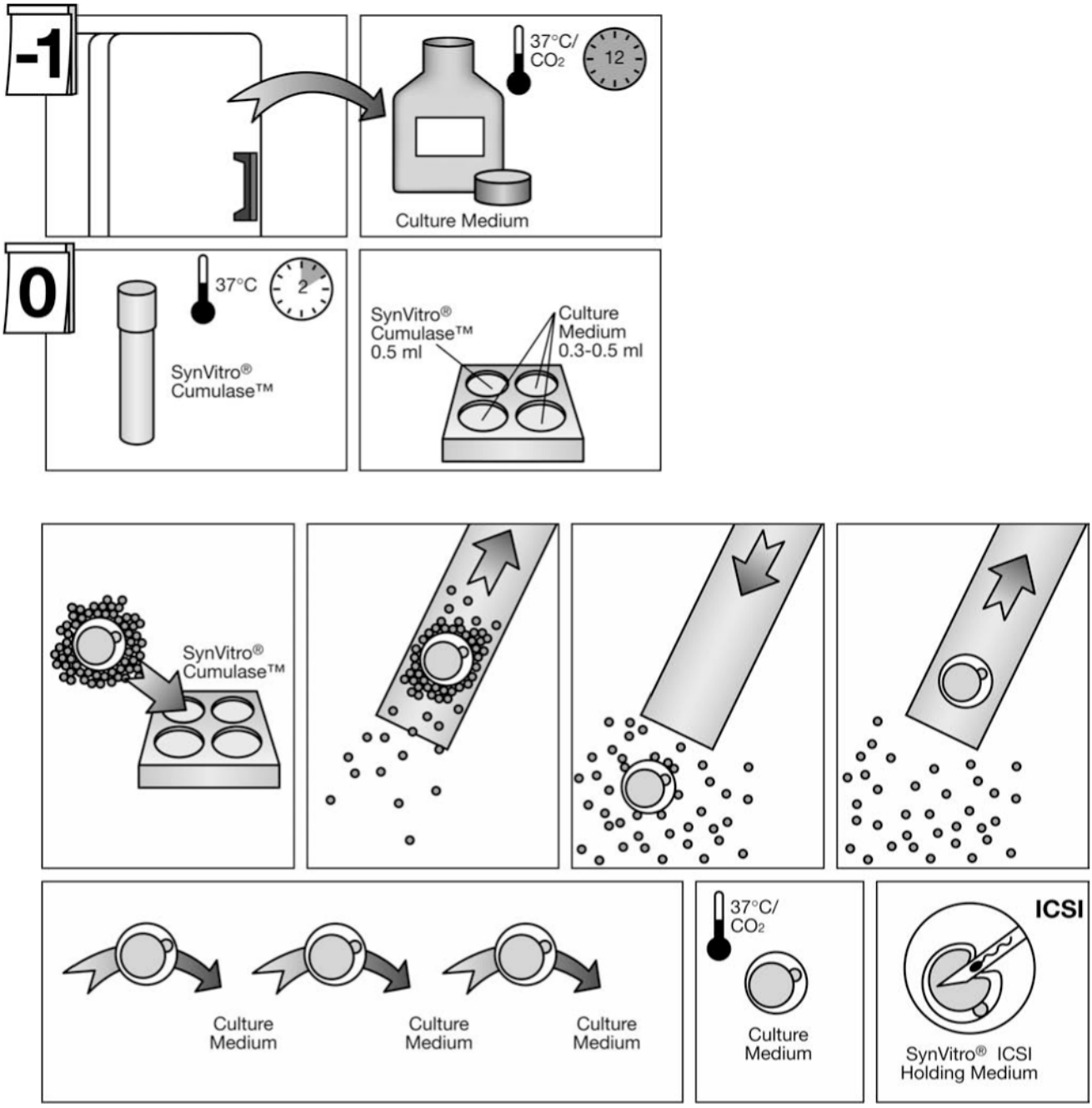
5. Transferir los ovocitos a una cavidad con Universal IVF Medium utilizando una pipeta de denudación, y remover las células de corona restantes de la misma manera.

6. Lavar los ovocitos completamente transfiriéndolos a las otras cavidades de la placa conteniendo Universal IVF Medium.

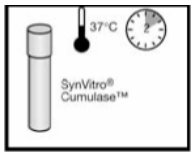
7. Clasificar los ovocitos en etapa de metafase II. La microinyección podrá ser llevada a cabo únicamente en ovocitos maduros (MII) con una zona pelúcida intacta, preferentemente sin vacuolas u otras anomalías vistas en el ooplasma.

8. Se recomienda dejar los ovocitos en Universal IVF Medium en la incubadora con control de CO_2 ambiente y a 37°C por un período de tiempo previo antes de proceder con el ICSI.

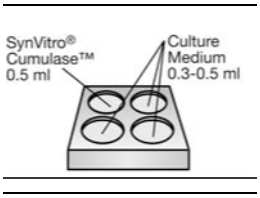
Rápida Referencia
SynVitro®Cumulase™ (Sistema abierto)



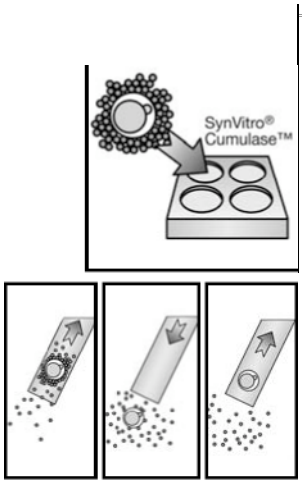
Instrucciones para uso
(SynVitro®Cumulase™): Sistema abierto



Antes de utilizarlo, pre-calentar SynVitro®Cumulase™ a 37°C por 2 horas con la tapa puesta.

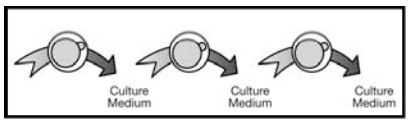


1. Llenar una de las cavidades en un plato de cuatro cavidades con SynVitro® Cumulase™ (0.5 ml) y otras tres cavidades con su medio de cultivo elegido pre-equilibrado.

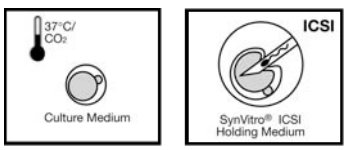


2. Colocar uno o varios complejos ovocitos cumulus en una cavidad con SynVitro®Cumulase™. Remover el complejo del cumulus agitando suavemente el ovocito arriba y abajo con una pipeta.

3. Transferir los ovocitos a una cavidad con el medio de cultivo, y remover las células de la corona restantes utilizando la pipeta de denudación de la misma manera.



4. Lavar los ovocitos por completo transfiriéndolos a varias cavidades conteniendo el medio de cultivo.



5. Los ovocitos son transferidos al recipiente de inyección y son colocados en micro gotas individuales cubiertas de Parafina Líquida pre-equilibrada. Se recomienda dejar el ovocito en el medio de cultivo por un corto período antes de proceder con el ICSI.

Preparación para el recipiente de inyección

A pesar de que hay varias maneras de hacer el ICSI, todas incluyen la manipulación de los ovocitos usando un tampón HEPES o medio con tampón de bicarbonato. El portafolio de los productos MediCult cumple con cualquier combinación de HEPES y de medio de bicarbonato que requiera. Si el operador ICSI es experimentado y la manipulación es llevada a cabo en Universal IVF Medium bajo Parafina Líquida, luego ella/el tendrá aproximadamente 5 minutos para conducir el ICSI antes que el pH del medio se convierta en crítico. El operador posee levemente más tiempo si utiliza el medio con tampón HEPES, pero aun debe considerar la pérdida de temperatura. Es por eso que el procedimiento no deberá tomar más de 10 minutos por plato.

Manejo del ovocito

SynVitro®ICSI Holding Medium (N. Cat 1585) se utiliza para el manejo de ovocitos cuando se lleva a cabo la inyección de espermatozoides durante el procedimiento ICSI. El medio es listo-para-ser-utilizado y puramente sintético, consistiendo de un EBSS modificado con SSR® y sin HSA.

Manejo

SynVitro®ICSI Holding Medium tiene un tampón HEPES y pH estable para ser utilizado fuera de la incubadora sin previo equilibrado. Calentar a 37°C previo al uso. Por favor notificar que este producto no contenga proteínas. Platos no-revestidos son por eso recomendados en orden para que las microgotas puedan pegarse a la superficie plástica.

Si se utilizan platos revestidos, se debe utilizar Sperm Preparation Medium en microgotas y con cobertura de Parafina Liquida. Remueva el Sperm Preparation Medium necesario de las microgotas bajo el microscopio, dejando la cavidad para que cada gota se llene con ICSI Holding medium.

Inmovilización del espermatozoide

El espermatozoide necesita ser inmovilizado previo a la inyección y esto se logra rompiendo la cola con la pipeta de inyección. MediCult ofrece 3 medios alternativos utilizados para disminuir la velocidad del movimiento del esperma con lo cual facilita su captura por medio de la pipeta de ICSI.

PVP Clinical Grade (N. Cat 1090) y **PVP Medium** (N. Cat 1089) contiene 10% polivinilpirrolidona (PVP) diluida en Sperm Preparation Medium.

PVP Clinical Grade ofrece la ventaja de un pack de 5 x 200 µl, con la habilidad de congelar los frascos por hasta 8 semanas dándole a uno un stock más flexible. Si se congela inmediatamente el día que es recibido, su fecha de expiración se extiende a 8 semanas. Previo al congelamiento, chequear que las capas se mantengan cerradas a presión bien ajustadas y envolver frascos individuales en el film sellado del laboratorio (Ej.: ParaFilm) para evitar la evaporación que pueda originar viscosidad en el PVP Clinical Grade una vez descongelado.

Manejo

Equilibrar por un mínimo de 30 minutos en CO_2 a 37°C previo al uso.
Se recomienda que el contenido entero del frasco sea mezclado agitando el medio hacia arriba y abajo en una pipeta estéril.

Cuando se utiliza PVP es importante controlar la velocidad de la disposición de espermatozoides dentro de los ovocitos ya que esto asegura la mínima cantidad de PVP que se inyecta dentro de los ovocitos. PVP es una sustancia orgánica polimérica que ha aumentado la preocupación acerca de sus potenciales efectos en los espermatozoides y en los ovocitos durante el ICSI.

SpermSlow™ (N. Cat. 1094) es un medio de selección de esperma para ICSI. En lugar de inmovilizar simplemente toda la muestra de semen, SpermSlow™ distingue activamente entre espermatoizoides maduros e inmaduros.

El protocolo de usuario de SpermSlow™, por lo tanto, difiere de los protocolos de tipo de inmovilización estándar (PVP).

SpermSlow™ presenta una alternativa natural a la polivinilpirrolidona (PVP). Una creciente preocupación con respecto al uso de PVP en ICSI se encuentra presente dado que es un polímero sintético que no puede ser digerido y quedara en el ovocito por un periodo prolongado.

El ingrediente activo en SpermSlow™ es hialuronato (HA), que es presente en el cuerpo humano incluyendo los alrededores del ovocito. Si durante el ICSI, el HA es colocado dentro del ovocito, es metabolizado naturalmente y no presenta riesgos al zigoto que se esta desarrollando.

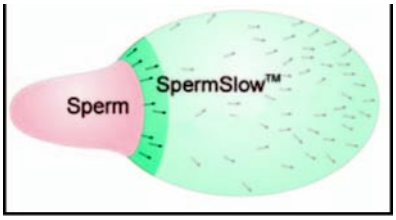
SpermSlow™ permite que se produzca una activa selección de espermatozoides cuando se lleva a cabo el ICSI. SpermSlow™ no es un agente de inmovilización (como el PVP); y es por eso que posee características ventajosas. HA forma un 'grilla' con el que los espermatozoides maduros crearan lazos. Es por todo esto que solo los espermatozoides maduros son frenados por SpermSlow™, mientras que los espermatozoides inmaduros circulan libremente.

Un estudio reciente muestra que los lazos HA seleccionan la población de espermas maduros. (Huszar G. et al., 2003)

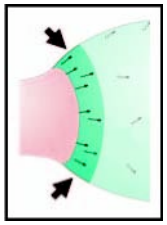
Función del SpermSlow™

(Refiérase al protocolo para un procedimiento detallado)

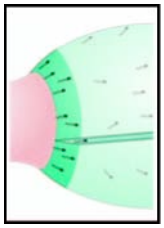
Cuando los espermatozoides son completamente maduros, están listos para crear un lazo con HA. Si la muestra de espermatozoides es agregada al medio conteniendo HA, el movimiento hacia adelante se dificulta para el espermatozoide maduro.



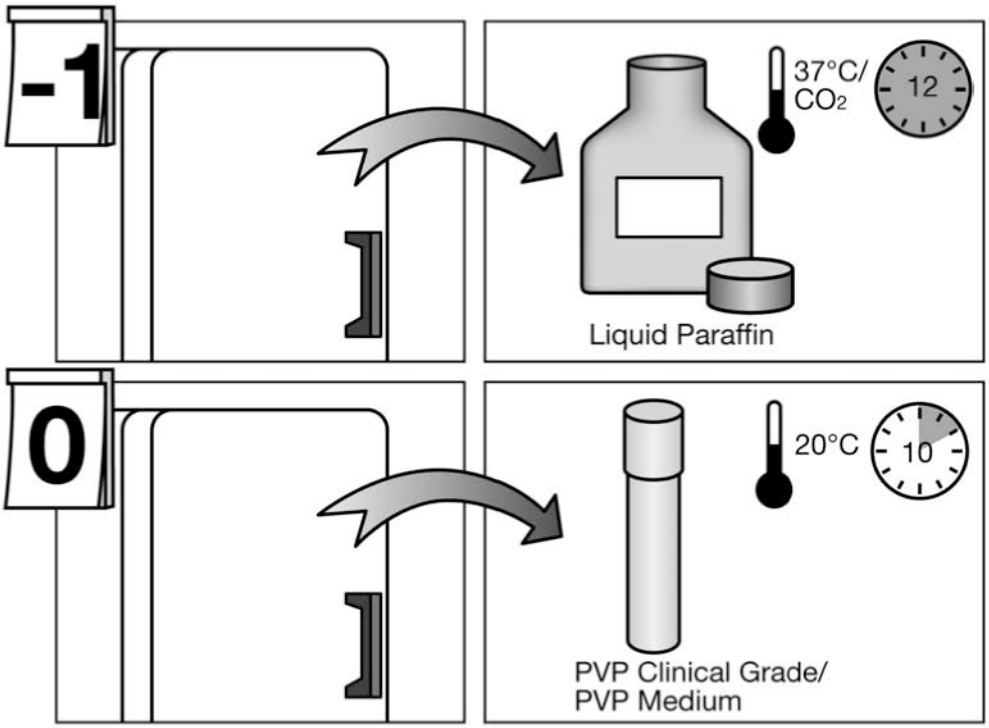
Es por todo esto que en SpermSlow™, los espermatozoides **maduros** crearan lazos con HA disminuyendo la velocidad mientras que el espermatozoide **inmaduro** continuara moviéndose libremente.
Visualmente, un esperma maduro mostrara buena motilidad, pero esta "cerrado en su lugar" por el HA, sin poder moverse hacia adelante.

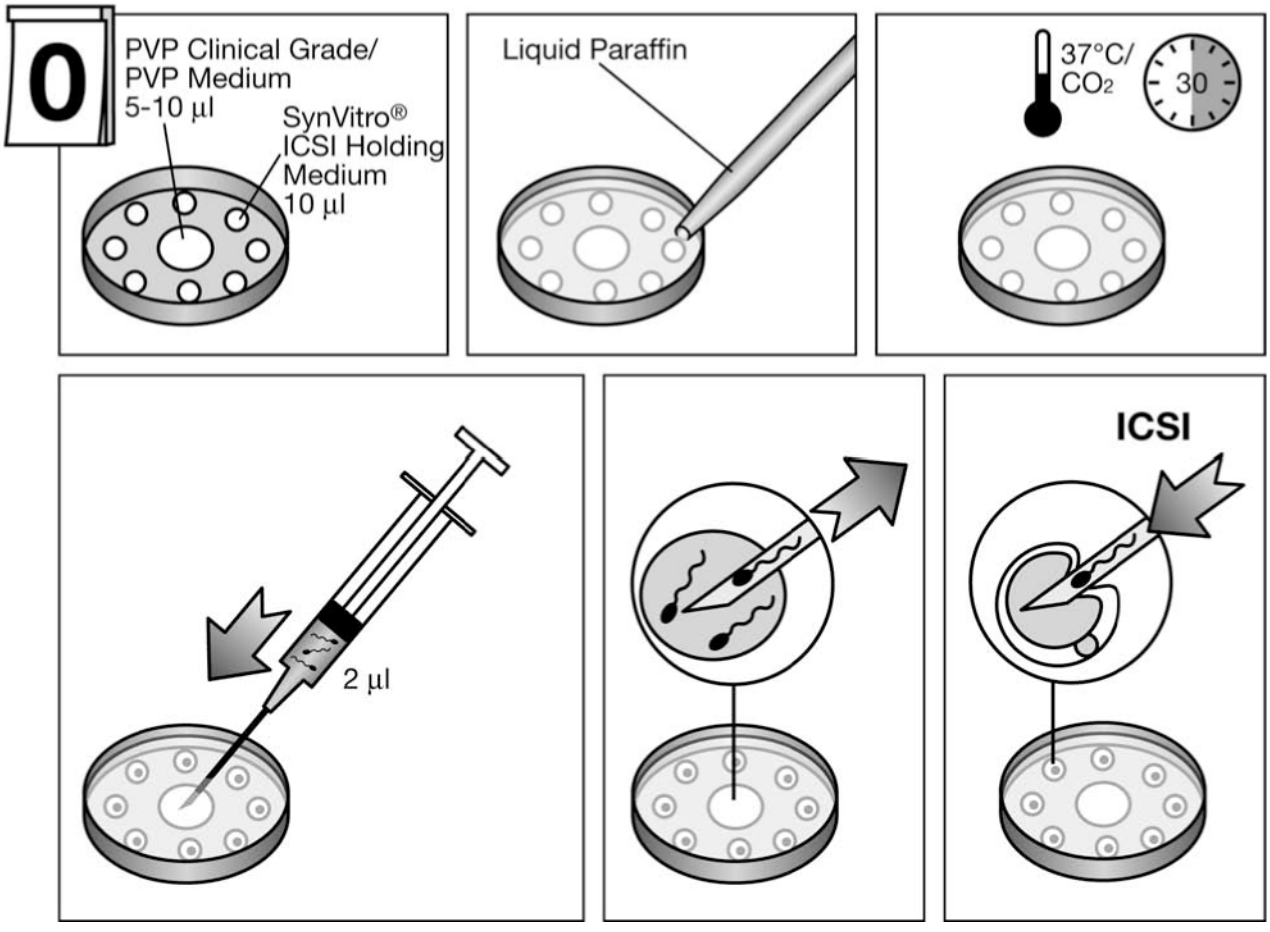


Ahora usted esta capacitado a seleccionar espermatozoides maduros con buenas características morfológicas para el ICSI. Por favor refiérase al protocolo en las siguientes páginas para un detallado procedimiento.



Rápida Referencia
PVP

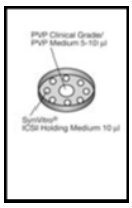




Instrucciones para uso (PVP):

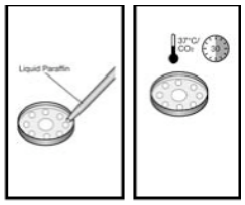
El protocolo requiere que suficiente Parafina Liquida (N. Cat 1010) sea pre-equilibrada la noche anterior en la incubadora con control de CO_2 y temperatura a 37°C.

1. Remover el PVP y el SynVitro®ICSI Holding Medium (N. Cat. 1585) del almacenamiento a 2-8°C y dejarlo a temperatura ambiente por 10 minutos.

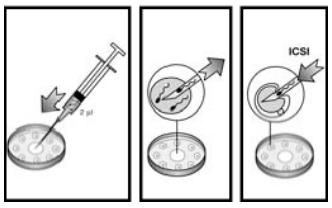


2. Dependiendo del número de ovocitos para la inyección, colocar en una pipeta un número correspondiente de 10 µl gotas de SynVitro®ICSI Holding Medium dentro del fondo del plato para ICSI.

3. En el medio del mismo plato colocar 5-10 µl gotas de PVP Clinical Grade o PVP Medium.



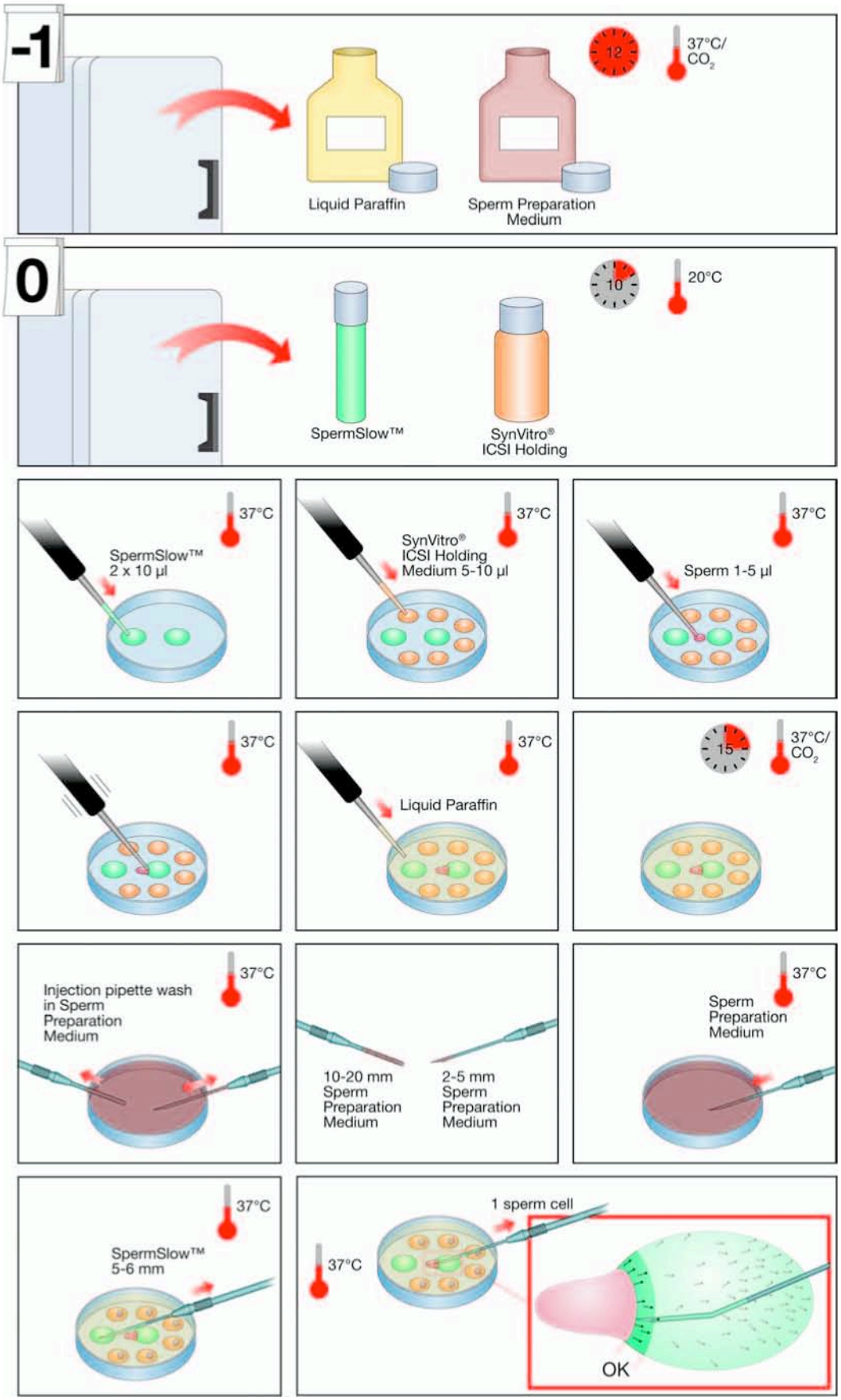
4. Cubrir con Parafina Liquida pre-equilibrada y colocar el plato en una incubadora con control de CO, y a 37°C por 30 minutos previos al uso.



5. Introducir 2 µl del esperma preparado y lavado a una gota de PVP Clinical Grade o PVP Medium. El PVP reducirá la motilidad del esperma y facilitará la captura y la carga de un único espermatozoide en la pipeta de inyección.

6. Ver la sección "El procedimiento ICSI."

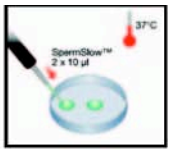
Rápida Referencia
SpermSlow™



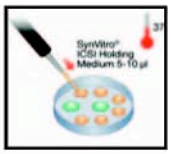
Instrucciones de uso (SpermSlow™):
Recuperar los ovocitos como se realiza normalmente y preparar el esperma de acuerdo al procedimiento elegido. Luego de la recuperación y la evaluación, los ovocitos son incubados en el medio de cultivo elegido, Ej. ISM1™ (N. Cat. 1050/1150) hasta la denudación utilizando Ej. SynVitro® Cumulase™ (N. Cat. 1512).

Este protocolo requiere que suficiente Parafina Líquida (N. Cat. 1010) y Sperm Preparation Medium (N. Cat. 1069 o 1070) deberan ser pre-equilibrados por la noche en una incubadora con control de CO, y a 37°C.

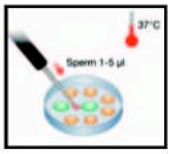
1. Remover el SpermSlow™ y SynVitro®ICSI Holding Medium (N. Cat. 1585) del almacenaje a 2-8°C y dejarlo a temperatura ambiente por 10 minutos.



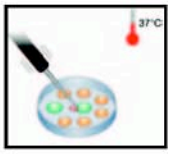
2. Colocar una pipeta de 2x10 µl de SpermSlow™ dentro del fondo de un plato ICSI, que podrá ser mantenido a 37°C durante el procedimiento entero.



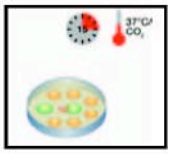
3. Dependiendo en el número de ovocitos utilizados en el procedimiento ICSI, colocar en una pipeta un número correspondiente de 5-10 µl gotas de SynVitro®ICSI Holding Medium



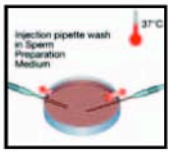
4. Introducir una pequeña cantidad de Ej. 1-5 µl del esperma preparado y lavado cerca del SpermSlow™ , dejarlo caer en el centro del plato.



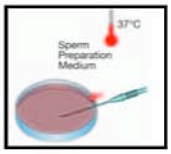
5. Utilizar la punta de la pipeta para crear un empalme entre la gota de esperma y la gota de SpermSlow™ en el centro.



6. Inmediatamente cubrir el plato con Parafina Líquida pre-equilibrada y colocarla en un CO, con la incubadora a 37 °C durante 15 minutos previos al uso.

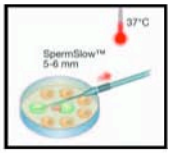


7. Lavar/enjuagar la pipeta de inyección en un Sperm Preparation Medium. Aspirar 10-20 mm dentro de la pipeta de manejo y 2-5 mm dentro de la pipeta de inyección.

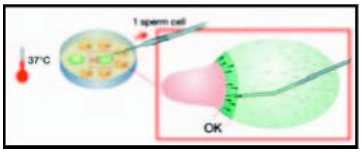


8. Expulsar el Sperm Preparation Medium de la pipeta de inyección dentro del plato de Sperm Preparation Medium.

9. Colocar un ovocito en cada gota de SynVitro®ICSI Holding Medium.



10. Aspirar 5-6 mm SpermSlow™ dentro de la pipeta de inyección.



11. Con cuidado seleccionar un espermatozoide maduro cerca del empalme de la gota del SpermSlow™ en el medio del plato. Buscar el espermatozoide que tenga la mejor morfología, que posea una cola móvil y haya creado un lazo con el grid de Hialuronato.

Por favor notar que cualquier espermatozoide que circule libremente en la gota de SpermSlow™ es un espermatozoide inmaduro y no deberá ser seleccionado.

El procedimiento ICSI

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) es el procedimiento donde el espermatozoide es inyectado dentro del ovocito. ICSI permite fertilización y embarazos en caso de severos factores de infertilidad masculina.

La inyección es llevada a cabo bajo un microscopio invertido con una platina térmica para mantener el plato ICSI y su contenido a 37°C.

〈 Si el espermatozoide es difícil de obtener o el operador es lento las placas deben ser guardadas regularmente en la incubadora para equilibrado.

Se pueden establecer menor cantidad de ovocitos establecidos por placa cuando el operador es inexperto o el caso presenta dificultades.

〈 Inmovilizar el espermatozoide correctamente golpeando la cola con la pipeta de inyección.

Aplastar la cola cuando se utiliza el PVP y gentilmente raspar la cola cuando se utiliza SpermSlow™. Si se aplasta la cola en SpermSlow™ la cola puede hincharse, dificultando su manejo en la pipeta de inyección.

⊙Inyectar el espermatozoide en lo profundo del citoplasma (75% del diámetro de los ovocitos) y asegurarse de que el espermatozoide no sea sacado para afuera con la pipeta de inyección.

⊙Asegurarse de que el oolemma se rompa para que el espermatozoide no sea expulsado al espacio perivitelino.

⊙Inyectar un mínimo volumen de PVP junto con el esperma – alternativamente utilizar SpermSlow™.

Procedimiento

1. Colocar un ovocito en cada gota de SynVitro®ICSI Holding Medium.

2. Golpear la cola del espermatozoide nadador con la pipeta de inyección. Es importante no dañar el cuello de la región del espermatozoide ya que este contiene el centriolo, que es crucial para la migración de cromosomas en la división celular. Inmovilización ineficiente de espermatozoides puede reducir las tasas de fertilización. Cargar el espermatozoide con su cola en primer lugar dentro de la pipeta de inyección.

3. Levantar la pipeta de inyección, moverla a la gota del ovocito superior, localizar el ovocito, y ajustar el filo en la membrana del plasma del ovocito.

4. Bajar la pipeta con el espermatozoide para que usted pueda verla claramente. Ajuste la presión de la pipeta para que el espermatozoide no se mueva.

5. Bajar la pipeta de sostén para que pueda ver el ovocito en el mismo campo visual. Succionar el medio suavemente dentro de la pipeta de manejo y ajustar la presión.

6. Ajustar el filo en la parte interna del toda la pipeta de sostén, que significa que el todo de la pipeta de sostén este a la misma altura que la parte media del ovocito. Con cuidado ajustar el ovocito a la pipeta de manejo. Ajustar el ovocito para que el cuerpo polar este en la posición 12 o la 6 en punto. Se debe mantener como una regla que la apertura de la pipeta siempre mire al cuerpo polar.

7. Enfoque nuevamente (20 x magnificación), colocar el espermatozoide casi en la punta de la pipeta de inyección y penetrar la zona pelúcida (puede que se necesiten pequeños ajustes en el tiempo de la penetración).

8. Penetrar dentro del ovocito completamente al otro lado de la zona pelúcida, retirar la pipeta si es necesario y llevar a cabo el estirado del oolema.

9. Colocar la pipeta de inyección hasta 75% del diámetro del ovocito y aspirar el citoplasma (20X). Asegurarse que la membrana del plasma se rompa y el espermatozoide sea inyectado dentro del citoplasma.

10. Cuidadosamente sacar la pipeta de inyección del ovocito y simultáneamente reducir la presión de la pipeta de manejo.

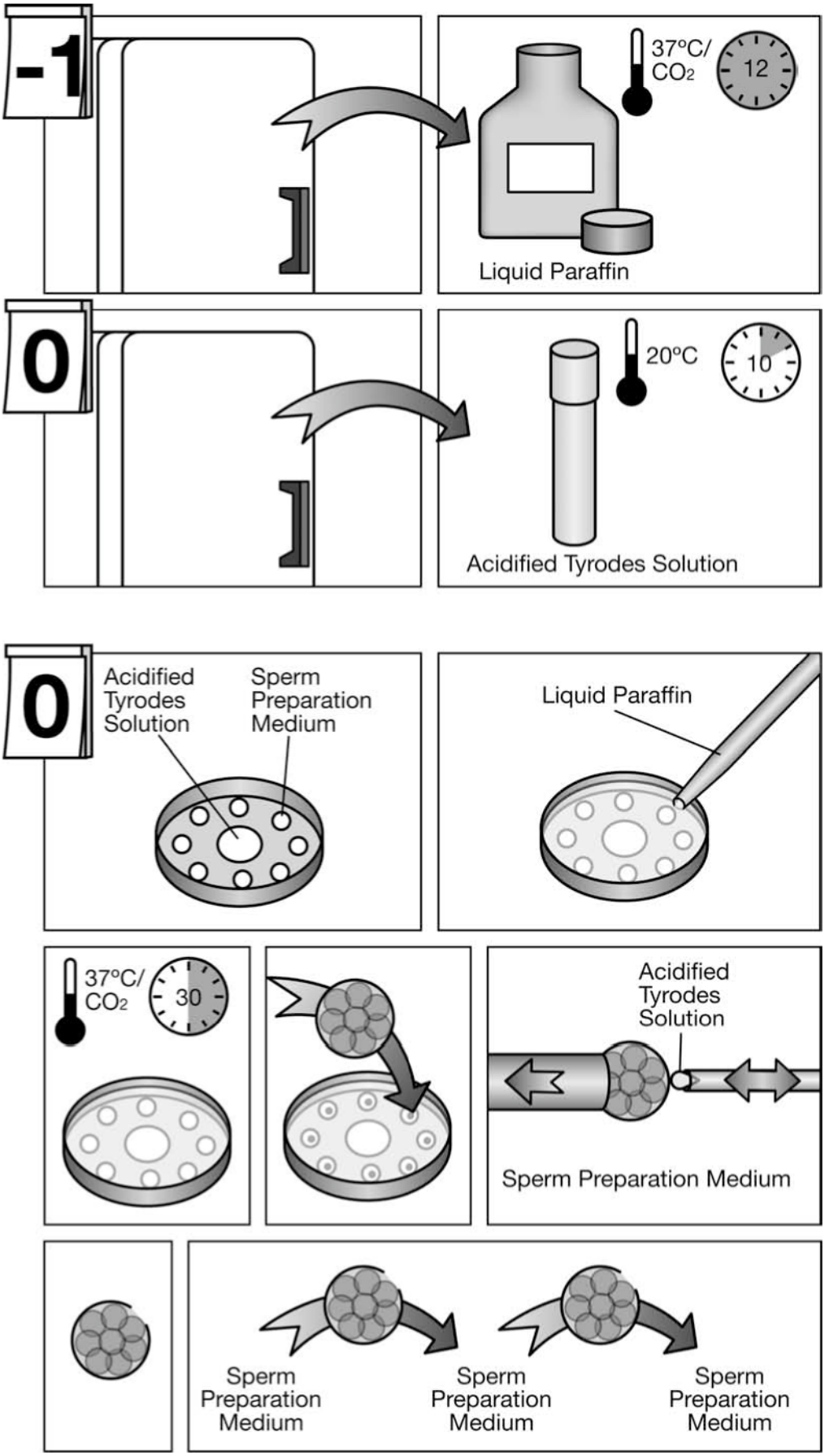
11. Liberar al ovocito y levantar la pipeta de manejo al máximo nivel con el botón cursor. La pipeta de manejo nunca debería tocar la gota del espermatozoide.

12. Mover la pipeta de inyección a la gota del esperma moviendo la platina del microscopio. *Repetir pasos 2 - 12*.

13. Luego de la inyección, los ovocitos deberán ser lavados e incubados en el medio de cultivo preferido por 16 18 horas.

Rápida Referencia

Solución Acidulada Tyrodes (referir a página 48)



Perforación de Zona

Durante este procedimiento una perforación es producida únicamente en la zona pelúcida del embrión, utilizando una solución ácida. La perforación se realiza para permitir la biopsia del embrión o facilitar su hatching.

- Cada zona difiere en consistencia y es por eso que deberá ser tratada independientemente.
- Exposición excesiva a la solución ácida es perjudicial para el embrión.
- En caso de hatching asistido, es importante que la perforación sea lo suficientemente grande para que el embrión escape durante la etapa de hatching - sin embargo no deberá ser demasiado amplio, ya que los blastómeros pueden llegar a escapar de la zona previo a la compactación.

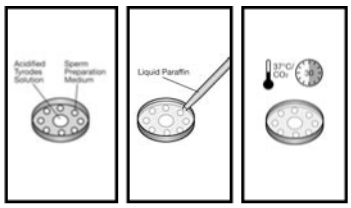
Solución Acidulada Tyrodes (N. Cat 1060) es una solución ácida lista-para-ser-utilizada que disuelve las glicoproteínas de la zona pelúcida donde son aplicadas. La solución incluye PVP para facilitar el control de la aspiración.

Nota! Para lograr una exitosa perforación de la zona el producto no deberá ser diluido.

Manejo

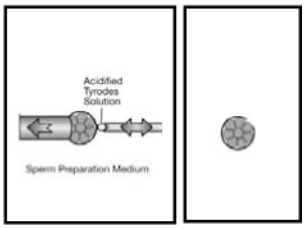
Calentar a 37°C previo al uso.

Instrucciones de uso (hatching asistido):



1. Preparar una placa de Petri con una microgota de Solución Acidulada Tyrodes y varias gotas de Sperm Preparation Medium (N. Cat. 1069/1070) pre-equilibrado. Cubrir la placa con Parafina Líquida (N.Cat. 1010) pre-equilibrada y colocar la placa en una incubadora con control de CO, y a 37°C por 30 minutos previos al uso.

2. Colocar cada embrión en una microgota de Sperm Preparation Medium.

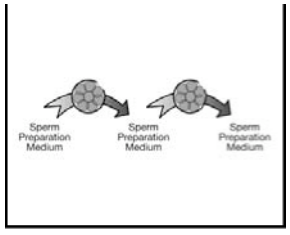


3. Cargar la pipeta de perforación de zona con Solución Acidulada Tyrodes y estabilizar el movimiento del fluido.

4. Sostener el embrión con la pipeta de sostén (sistema de jeringa de succión) para que la micropipeta llena con Solución Acidulada de Tyrodes sea expuesta en la área de las 3 en punto. Con la pipeta rozando la zona, moverla levemente para adelante y para atrás mientras suavemente se expulsa una pequeña cantidad de Solución Acidulada de Tyrodes. La succión es recomendada en este punto, para aspirar todo la solución acida expulsada.

Nota! El tiempo total para romper la zona deberá ser aproximadamente de 5-7 segundos.

5. Es crucial seguir el procedimiento cuidadosamente para no herir a los blastómeros. En la mitad de los casos, aproximadamente, la zona queda abierta, mientras que en la otra mitad de la zona puede ser ensanchada mecánicamente movilizando la micro aguja por la abertura en un movimiento de rompimiento para alcanzar a obtener una perforación aun superior (15-20 μm).



6. Inmediatamente lavar el embrión (s) enteramente transfiriéndolo a varias gotas de Sperm Preparation Medium y finalmente colocarlo en el medio para transferencia embrionaria. El manejo subsiguiente de los embriones deberá ser suave para reducidir el riesgo de pérdida de blastómeros.

Biopsia del embrión

Este procedimiento usualmente es llevado a cabo en los embriones del Día 3, antes de que ocurra la compactación de los embriones, y es generalmente es realizada temprano por la mañana. Uno o dos blastómeros son removidos del embrión para diagnostico de pre implantación genética (PGD).

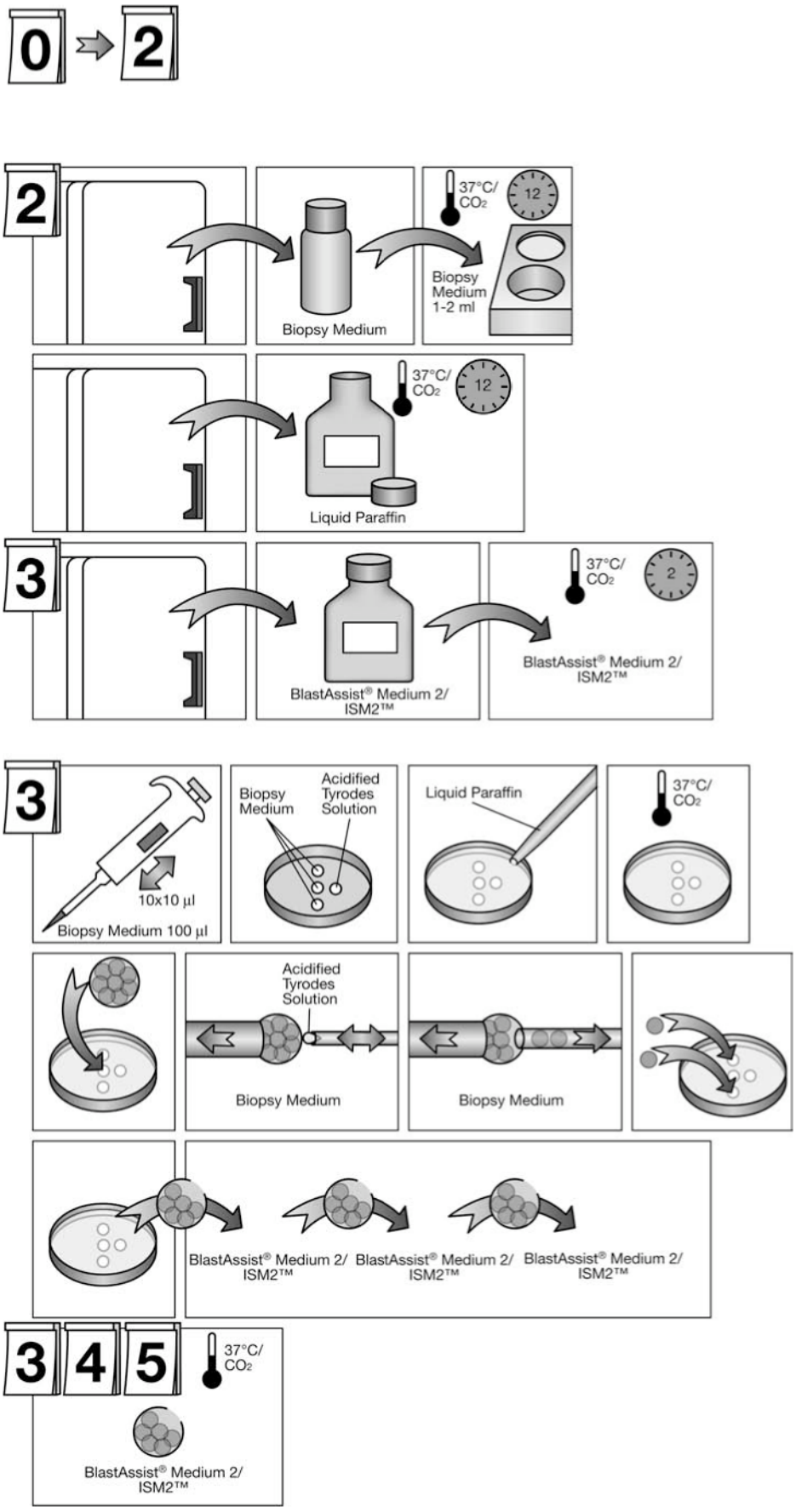
- Emplear tiempo ajustando la posición del embrión en la pipeta de manejo para que el blastómero nucleado pueda ser claramente identificado y se le practique una biopsia.
- Una tercera pipeta y un sistema de aspiración es necesario para remover el blastómero (s) al que se le practico la biopsia. Utilizar únicamente las pipetas de más alta calidad ya que los bordes mellados en la pipeta de biopsia pueden causar lisis en el blastómero (s).
- En caso que ocurra una compactación, se producirán empalmes entre los blastómeros y serán difíciles de remover. Ser paciente, tirar y quitar la pipeta a través y atrás para facilitarle la salida al blastómero.

Biopsy Medium (N. Cat 1062) es libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} y es por eso que afloja los empalmes entre los blastómeros del embrión, ya que estos son dependientes de calcio y magnesio. Es por eso que se recomienda mantener la exposición a un mínimo para evitar efectos potencialmente deletéreos en el desarrollo del embrión. Biopsy Medium contiene HEPES y tampón de bicarbonato, pero este no deberá estar fuera de la incubadora por más de 10 minutos.

Manejo

Equilibrar por un mínimo de 2 horas en incubadora con control de CO_2 y a 37°C previos al uso.

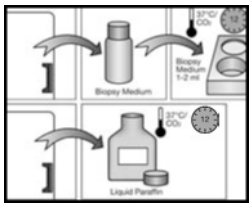
Rápida Referencia
Biopsy Medium



Instrucciones de uso (Biopsia del embrión):

Día 0 al 2

1. Seguir el protocolo recomendado para la fertilización y el cultivo de la etapa de clivage en BlastAssist®System (N.Cat 1039/1040) o ISM1™ (N.Cat. 1050/1150)

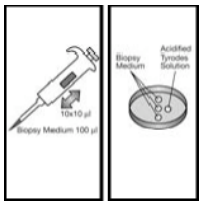


Día 2 (2 días después de la recolección de los ovocitos)

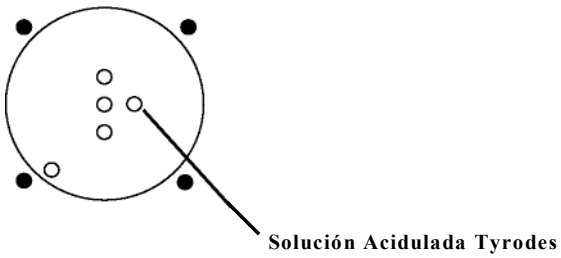
2. En una placa de cultivo de tejido colocar un volumen de Biopsy Medium suficiente para la biopsia del embrión, cubrir con Parafina Liquida (N. Cat. 1010) pre-equilibrada y calentar a 37°C en incubador de CO_2 por un mínimo de 2 horas (permitir 30 µl por embrión mas 100 µl para lavar la punta de la pipeta si es necesario). Recordar pre-equilibrar suficiente Parafina Liquida para el procedimiento de la biopsia (permitir 4 ml por embrión).

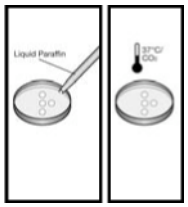
Día 3 (día de la biopsia del embrión)

La biopsia en etapa del clivage es llevada a cabo temprano por la mañana del día 3 posterior a la inseminación.



3. Media hora antes de la biopsia, preparar la placa de la biopsia para cada embrión y etiquetarla con el nombre del paciente y el número de embrión. Tomar una pipeta automática regulada a 10 µl con una punta estéril y lavar la punta (x10) con Biopsy Medium. Pipetee 3 gotas de Biopsy Medium y una gota de Solución Acidulada de Tyrodes (N.Cat. 1060) como muestra el diagrama.



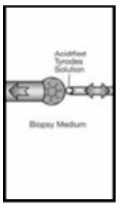


Cubrir inmediatamente la placa con 4 ml de Parafina Liquida pre-equilibrada para evitar la evaporación y almacenar las placas a 37°C en un incubador de CO_2 hasta ser requerido. Al mismo tiempo preparar micro gotas adicionales o cavidades/platos del medio de cultivo extendido correspondientemente etiquetado, lavar y cultivar el embrión mientras el diagnóstico es llevado a cabo.

Lista de materiales

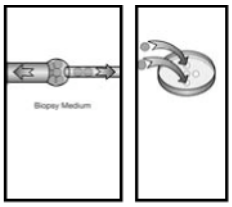
1x placa de biopsia por embrión
1x placa por embrión para el lavado.
Número apropiado de micro gotas o cavidad/recipiente para el cultivo final del embrión al que se le practico la biopsia.

4. Tomar el apropiado pre-equilibrado y etiquetado plato de la biopsia y transferir asépticamente el embrión dentro de la gota en la mitad del plato.

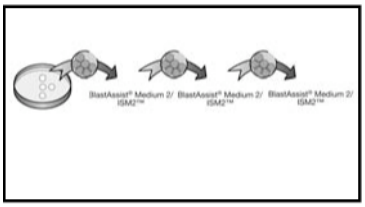


5. Purgue las pipetas con las soluciones apropiadas e inmovilice el embrión para que se le practique la biopsia. La de-compactación deberá ser completada en un corto periodo (1-10 minutos) y el embrión deberá ser observado durante el proceso.

6. Poner la pipeta de Solucion Acidulada de Tyrodes en contacto con la zona del embrión. Tener cuidado de utilizar únicamente el volumen más pequeño posible de la Solución Acidulada de Tyrodes para facilitar el proceso de perforación. Ver la sección "Perforación de la zona."



7. Una vez que una pequeña perforación en la zona es obtenida, los blastomeros deberán estar accesibles a la pipeta de muestreo. Para minimizar la reducción en la masa, uno dos de los más pequeños blastomeros se les practica una biopsia y es colocada en las correspondientes gotas de Biopsy Medium.



8. Al finalizar la biopsia, el embrión deberá ser transferido a otra placa separada de lavado, donde será transferido por microgotas o pozos para cultivo extendido con medio de cultivo (BlastAssist®Medium 2 o ISM2™) para remover todos los rastros de Biopsy Medium y Solución Acidulada de Tyrodes.

9. Finalmente transferir el embrión dentro de un plato nuevo con microgotas/cavidad pre-equilibradas del medio de cultivo cubierto con Parafina Liquida pre-equilibrada.

10. El plato de biopsia con blastomeros aislados esta listo para la preparación de la muestra.

Cuando el PGD esta completado, se evalúa la morfología de cada embrión y se cuenta el numero de células con la máxima exactitud posible para obtener una indicación de la división posterior a la biopsia. La transferencia del embrión es llevada a cabo usualmente en el Día 5, luego que el diagnóstico genético se haya completado.

Se consulta con los otros miembros del equipo PGD y finalmente con las parejas mismas, se selecciona un máximo de dos embriones no afectados con la mejor morfología para ser transferidos.

CRIOPRESERVACION

Este es el proceso de congelado, almacenaje, descongelado de gametas y embriones. Las muestras son congeladas en pajuelas, ampollas o frascos. Las características de enfriado de las ampollas y los frascos, sin embargo, difieren de las pajuelas y es por eso que los protocolos de congelado dados en esta sección pueden ser adecuados para los de estas ultimas.

La criopreservación de las gametas y los embriones implica una exposición inicial a los crioprotectores, llevándolos a temperaturas bajo cero, descongelando y finalmente diluyéndolos y removiendo los crioprotectores, con un regreso a un ambiente fisiológico que permite un futuro desarrollo.

La creciente demanda para métodos de criopreservación exitosa resulta de un más pequeño número de embriones transferidos en orden de reducir las tasas de embarazos múltiples en ART. Un exitoso procedimiento de congelado y descongelado asegura el mantenimiento de la integridad estructural de la célula al igual que sus características funcionales. Un manejo adecuado de la presión osmótica es crucial para el éxito y es importante evitar el daño dado por la formación de hielo intracelular. Si el proceso de deshidratación ha sido inadecuado, cristales largos e intracelulares serán formados. Es por todo lo mencionado que las células son deshidratadas antes y durante el procedimiento de enfriado.

La formación de hielo extracelular es un evento crucial para el comienzo de la perdida controlada de agua de las células. Un proceso llamado sembrado induce esto, tocando con un algodón pre-enfriado o fórceps a la interfase liquida-aérea de la pajuela justo cuando la solución llega al punto critico de cristalización. El sembrado puede ser inducido en la temperatura incorrecta, si hay partículas o impurezas en las pajuelas. Algodones pre-enfriados o fórceps son sumergidos en nitrógeno líquido previo al sembrado.
Todos los métodos de congelamiento desarrollados hoy se apoyan en la presencia de uno o más crioprotectores. 1,2-propanediol, glicerol, DMSO (dimetil sulfoxido) y etilen glicol son crioprotectores intracelulares o penetrantes. Su peso molecular es relativamente bajo (MW < 100). Otros compuestos que, como resultado del tamaño o polaridad, quedan en la solución extracelular, incluyen la sacarosa; las proteínas y las lioproteinas. El modo de la acción del crioprotector es complejo. Crean lazos con el agua y reducen los efectos tóxicos de las altas concentraciones de los compuestos. Además protegen las células durante el lento congelado cuando las células están bastante deshidratadas y son rodeadas por sales concentradas. En concentraciones altas, los crioprotectores minimizan el daño causado por la formación de hielo, ya que estos hacen que el agua forme estructuras de vidrio antes que cristales de hielo.

- Los resultados de la cryopreservacion dependen de la tasa de éxito de base de la clínica. Si los resultados frescos de FIV/ICSI son bajos esto será reflejado en los resultados luego de la transferencia de embriones congelados/descongelados (FER).
- Los resultados de la criopreservación son dependientes de los gametos y la selección del embrión / el manejo así como el equipo de congelación. Utilizar solo la maquina de más alta calidad de criopreservación, dispositivos de almacenado, pajuelas/ ampollas, frascos y medios de criopreservación.
- Usted nunca deberá tocar la pajuela en la que las gametas y los embriones son localizados.

  Todos los equipos de congelado deben ser perfectamente mantenidos y calibrados. La cantidad de nitrógeno liquido utilizado es dependiente de cada equipo y del sistema de almacenado.

Criopreservación del espermatozoide

- Para evitar los efectos citotóxicos del espermatozoide muerto, etc. se recomienda que la muestra de semen se congele justo después de la recolección.
- Evitar la exposición de pajuelas al aire después del congelado ya que esto puede causar el descongelado de la pajuela. La membrana plasmática del espermatozoide es muy sensible y el manejo descuidado de la pajuela puede matarlo dando como resultado una tasa baja de supervivencia de espermatozoides.
- El glicerol es toxico para espermatozoides y es por eso que la supervivencia posterior al descongelado deberá ser rápidamente evaluada y la muestra de esperma deberá ser lavada y los rastros de glicerol deberán ser removidos.

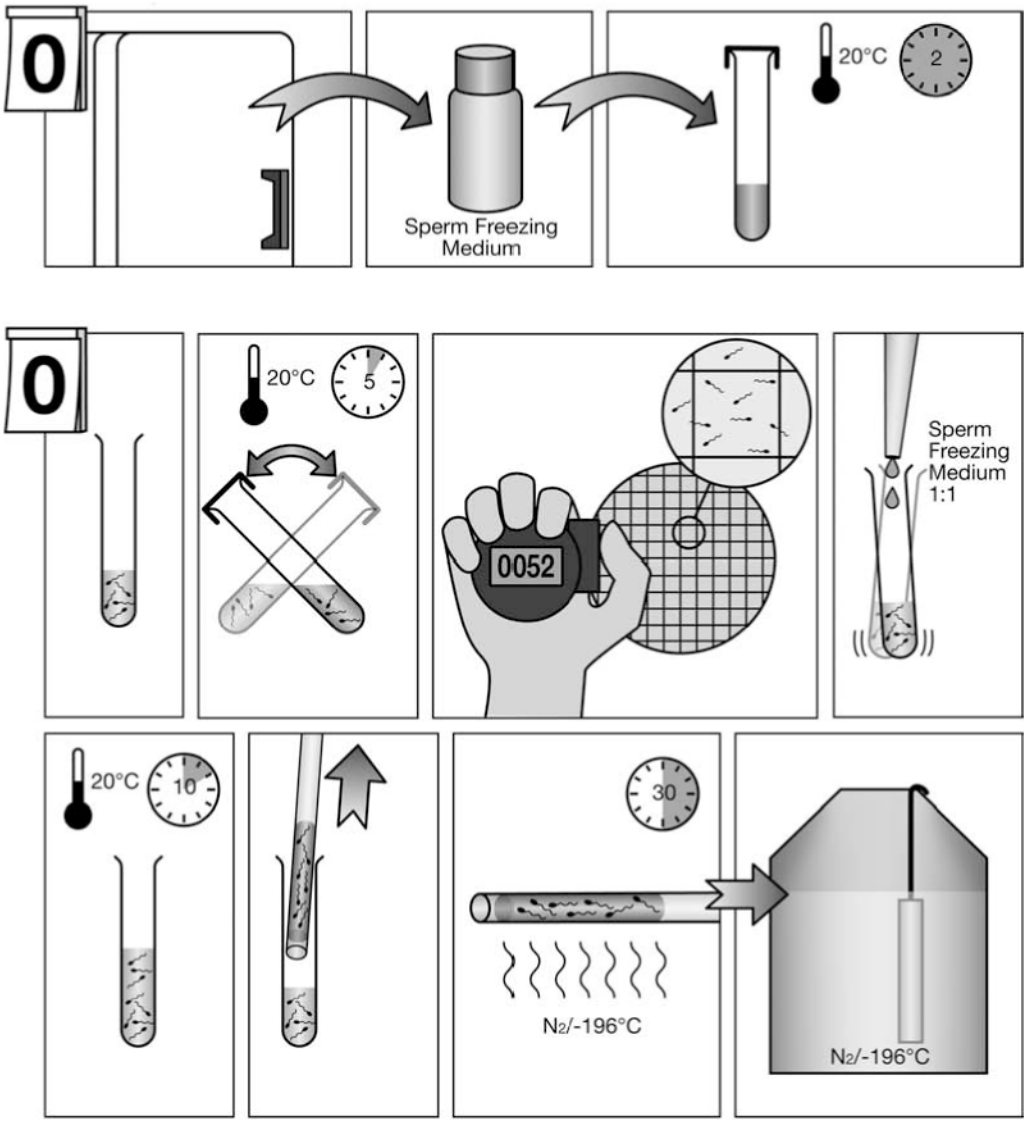
Sperm Freezing Medium (SFM) (N.Cat 1067) es un medio listo-para-ser-utilizado con glicerol. Un protocolo de trabajo sigue el tradicional 1:1 mix con plasma seminal. El medio es formulado utilizando una solución modificada Tyrodes, con SSR® y HSA. SFM ha sido comparada con medios basados en la yema del huevo utilizando el ensayo de la Hemizona. No se vieron diferencias de motilidad en el medio de descongelado pero los números de espermatozoides adheridos a la zona fue 50% mas alta con SFM (Mahony, MRB Laboratory, 1999).

Manejo

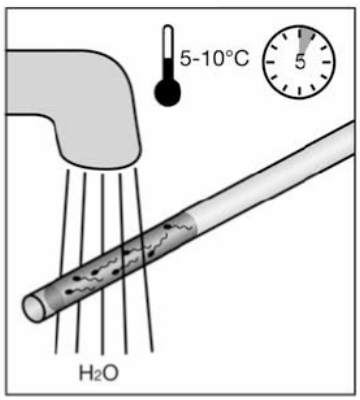
Calentar a temperatura ambiente previo al uso.

Rápida Referencia
Sperm Freezing Medium

Congelado:

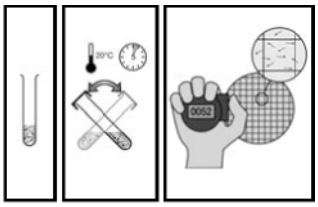


Descongelado:

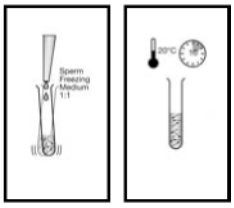


Instrucciones de uso (Sperm Freezing Medium):

Congelado:



1. Luego de la licuefacción, medir el volumen total del eyaculado y llevar a cabo el análisis del semen como es requerido.

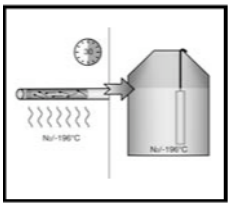


2. Asegurarse que la muestra de semen y Sperm Freezing Medium estén a temperatura ambiente y diluir el semen 1:1 (v/v) con el Sperm Freezing Medium. El medio deberá ser agregado en cuentagotas al semen y la solución deberá se cuidadosamente mezclada luego de cada adición.

3. La mezcla se deja a temperatura ambiente por un mínimo de 10 minutos.

4. Cargar el semen diluido en pajuelas o crío viales y sellarlos de acuerdo a lo recomendado por el fabricante.

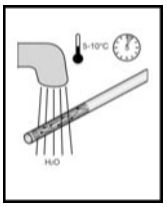
NOTA! Es de mucha importancia que usted deje espacio de aire en la parte mas baja de la pajuela para dejar lugar a la expansión de la solución durante el congelado.



5. Suspender las pajuelas horizontalmente por 30 minutos, justo sobre la superficie del nitrógeno líquido. Los crío viales deberán ser adheridos a un porta viales y luego suspenderlos sobre la superficie de nitrógeno liquido por el mismo periodo de tiempo. Alternativamente, utilizar el programa de criopreservación de esperma disponible en su maquina de congelación.

6. Finalmente transferir las pajuelas o crío viales dentro del nitrógeno liquido y almacenar a -196°C.

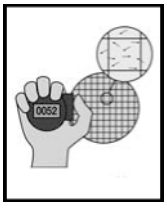
Descongelado:



1. Remover pajuelas o crío viales del nitrógeno líquido y colocarlos en agua corriente durante 5 minutos.

2. Abrir las pajuelas o crío viales de acuerdo con las instrucciones del fabricante y remover el semen descongelado.

3. Diluir el semen con Sperm Preparation Medium (1:1) para reducir el efecto toxico del glicerol.



4. Rápidamente evaluar la supervivencia del esperma. Si es necesario descongelar pajuelas adicionales para la preparación.

5. Inmediatamente preparar el esperma por el método de densidad del gradiente utilizando SupraSperm® (N. Cat 1091/1092 o 1097) o el procedimiento swim-up utilizando Sperm Preparation Medium (N. Cat. 1069/1070). Por favor referirse al protocolo específico recomendado para el uso de cada producto.
Nota: Concentrando el esperma previo al congelado puede aumentar la recuperación posterior al descongelado de las muestras de semen con baja concentración espermatozoides. Se recomienda una concentración final de un mínimo de 10 millones/ml.

Congelación de ovocitos

Dado que el almacenado de los ovocitos posee claras ventajas, especialmente para jóvenes pacientes recibiendo quimioterapia o atravesando una ovariectomia, ha sido un desafió para los investigadores del ART para encontrar un método efectivo para la criopreservación de ovocitos.

Uno de los pioneros en este campo, la Dra. Raffaella Fabbri, ha desarrollado formulas que contienen varias concentraciones de sacarosa junto con un procedimiento lento de congelado. Este trabajo ha resultado en las formulas de OocyteFreeze™ y OocyteThaw™, que han sido desarrollados y evaluados por la Dra. Fabbri en el centro IVF, en la Universidad de Bologna, Italia. Esto muestra las tasas de supervivencia que son altas como en un 82%. Los resultados fueron publicados en Human Reproduction, 2001.

El estudio ha mostrado que la tasa de supervivencia depende de la cantidad de tiempo en que los ovocitos son expuestos al crioprotector antes de que la temperatura baje. La tasa de supervivencia de los ovocitos aumenta de 56% a 70% si se prolonga el tiempo de exposición de 10 a 15 minutos.

La Dra. Fabbri *et al.,* 2001 también ha comparado varias concentraciones de sacarosa y ha observado que la tasa de supervivencia aumenta en proporción con la concentración de sacarosa. La tasa de supervivencia de ovocitos humanos fue de 82% utilizando una solución de sacarosa de 0.3 M en OocyteFreeze™.

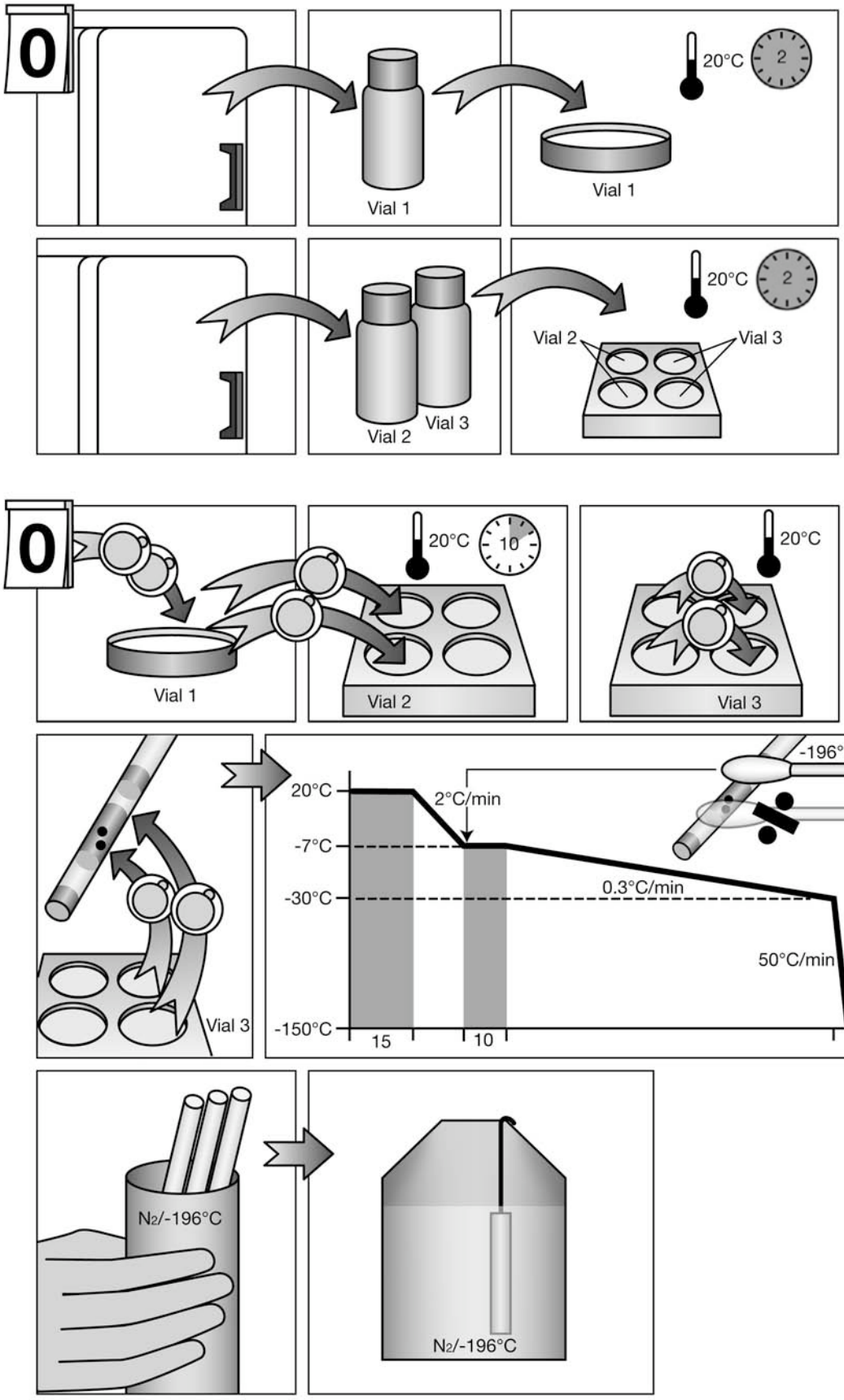
- Congelar solo los ovocitos maduros (MII)
- Antes de que los ovocitos sean congelados son parcialmente denudados y solo las células del cumulus más cercanas a la zona pelúcida quedan.
- El ICSI se recomienda para la fertilización de los ovocitos congelados-descongelados, ya que la zona pelúcida se endurece luego de la criopreservación.
- Hatching asistido del embrión resultante puede mejorar la tasa de implantación.

OocyteFreeze™ (N. Cat 1048) es listo-para ser-utilizado con propanediol 1,2 y sacarosa de acuerdo al método Fabbri *et al.,* 2001. Las soluciones de congelado son formuladas utilizando Tampón Fosfato Salino de Dulbecco (PBS), con HSA y alfa- & beta globulinas. La solución de tampón fosfato es utilizada para que todos los pasos sean llevados a cabo fuera de la incubadora y a temperatura ambiente.

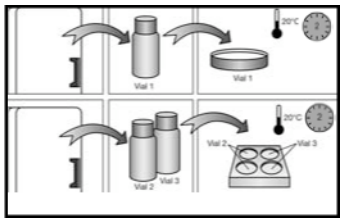
Manejo

Calentar a temperatura ambiente.

Rápida Referencia
OocyteFreeze™



Instrucciones para uso (OocyteFreeze™)

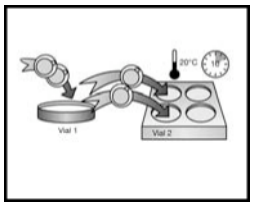


1. Colocar etiquetas en las placas para las soluciones de congelado.

- Una placa de Petri (Placa 1) es preparada utilizando 3 ml del Frasco 1 en el que los ovocitos son lavados.
- Preparar una placa de 4 cavidades (Placa 2), con las dos cavidades de la derecha conteniendo 0.5 ml del Frasco 2 y las dos de la derecha conteniendo 0.5 ml del Frasco 3.

Equilibrar a temperatura ambiente

2. Rotular las pajuelas con información del paciente. No escribir directamente en las pajuelas ya que los solventes pueden penetrar en ellas y dañar al ovocito, por eso utilizar cinta especial para protegerlas. Si se utilizan tapones, la información del paciente puede ser directamente transferida dentro de los tapones previos a la inserción dentro a las pajuelas.

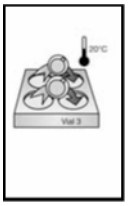


3. Aspirar una parte de la solución de congelado del Frasco 2 seguido por la aspiración de los ovocitos de la placa 1. 1-2 ovocitos por placa son transferidos de la placa 1 a la placa 2 donde son colocados en las cavidades en la derecha y mantenidos durante 10 minutos.

NOTA! Los ovocitos flotaran a la superficie del medio y lentamente se hundirán al fondo de la placa. Es por eso que es una ventaja si usted "captura" cuidadosamente a los ovocitos y los coloca en el fondo del plato.

4. Justo antes de que los ovocitos sean transferidos a la solución del Frasco 3 la parte interna de las pajuelas es lavada con la misma solución pero de otro plato.

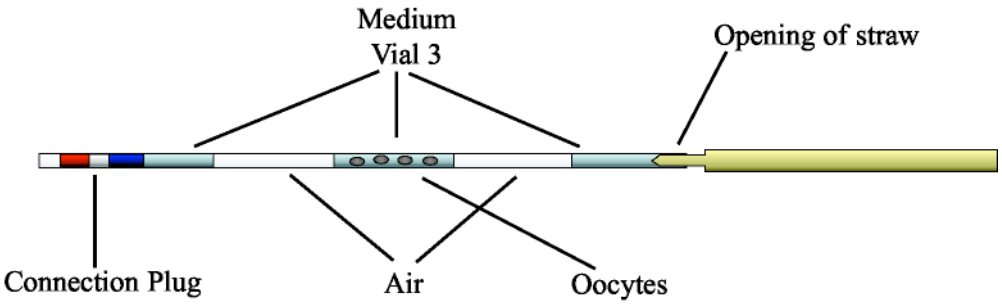
NOTA! Juntar aire en la jeringa ya que esto facilita remover el remanente de la solución del Frasco 3. No permitir que la solución se ponga en contacto con el tapón.



5. Colocar la solución del Frasco 3 en una pipeta. Cuando la alarma del reloj suene, cuidadosamente sacar los ovocitos y transferirlos a la cavidad del lado derecho de la placa.

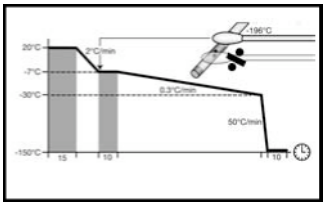
Ver los pasos 6-8 de la próxima página ⟶

6. Utilizando este medio como un medio de transferencia, cargar rápidamente los ovocitos en la pajuela de la misma manera en la que se lleva a cabo el ET. Cuando la primera columna del medio toca el tapón se sellará impidiendo todo movimiento futuro de la pajuela. (Ver diagrama a continuación).



7. Sellar la abertura de la pajuela con un tapón, para que el nitrógeno liquido no penetre en la pajuela. Repetirlo para todos los ovocitos.

Nota! No se recomienda que se sellen las pajuelas con calor ya que esto formaría grietas y liberaría materiales tóxicos de las mismas.



8. Las pajuelas son colocadas en la maquina de congelamiento y mantenidas durante 15 minutos en temperatura ambiente (20°C) antes de que comience el programa de enfriado:

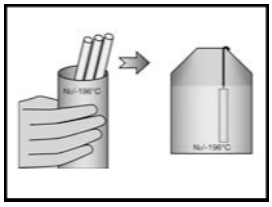
⟨ Enfriar desde temperatura ambiente hasta -7°C en pasos de 2ºC por minuto.

⟨ Cristalizar manualmente a -7°C, y mantener la temperatura durante 10 minutos.

NOTA! Cuando las soluciones son blancas el seeding ha sido iniciado. No cristalice la pajuela cerca del ovocito y no la deje caer ni sacudir. Si entra aire a las pajuelas se reduce la supervivencia del ovocito. I

⟨ Enfriar desde -7°C hasta -30°C en pasos de 0.3°C por minuto.

⟨ Enfriar de -30°C a -150°C en pasos de 50°C por minuto.



⟨ Luego de estabilizar la temperatura durante 10-12 minutos, las pajuelas son transferidas al tanque de nitrógeno liquido y almacenadas hasta su descongelado.

NOTA! Se debe tener mucha precaución durante el manejo de las pajuelas en las temperaturas bajas dado que estas pueden descongelarse con velocidad.

Descongelado de ovocitos

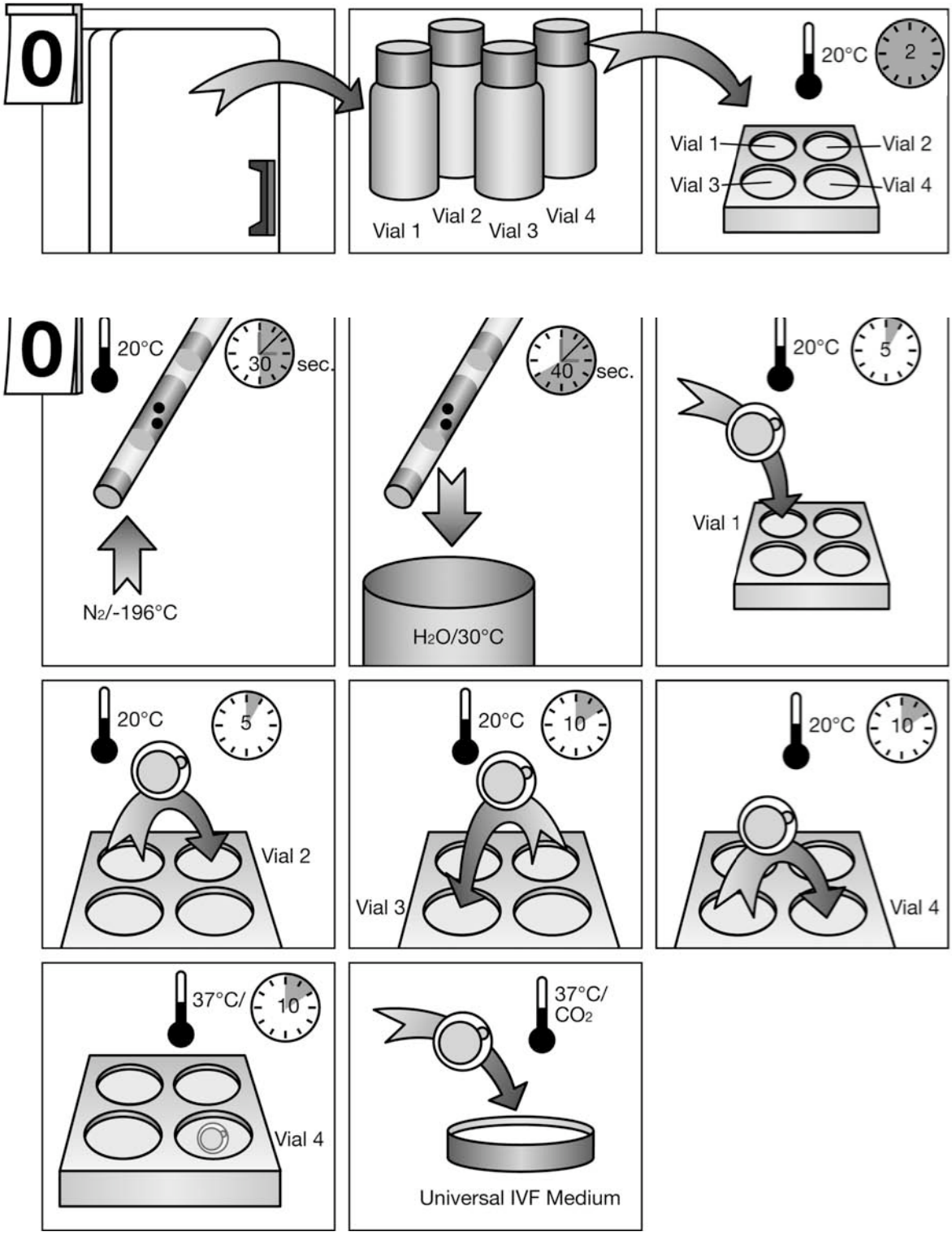
OocyteThaw™ (N. Cat 1049) es listo-para-ser-utilizado con 1,2-propanediol y protocolo de sacarosa de acuerdo con el método Fabbri *et al.,* 2001. Las soluciones son formuladas utilizando PBS, con HSA y alfa- & betaglobulinas, y es por eso que son un sistema de medio complementario para el uso con OocyteFreeze™.

Manejo

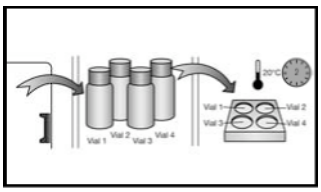
Calentar a temperatura ambiente previo al uso.

Rápida Referencia

OocyteThaw™



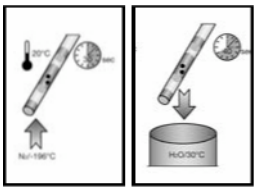
Instrucciones de uso (OocyteThaw™):



1. Preparar una placa de 4 cavidades con las soluciones de descongelado.

A: 0.5 ml del Frasco 1 cavidad
B: 0.5 ml del Frasco 2 cavidad
C: 0.5 ml del Frasco 3 cavidad
D: 0.5 ml del Frasco 4.

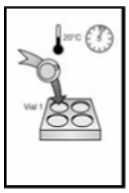
Equilibrar a temperatura ambiente.



2. Remover las pajuelas del nitrógeno líquido y mantenerlas a temperatura ambiente durante 30 segundos. Luego colocar las pajuelas en baños de agua a 30º C durante 40 segundos hasta que hayan desaparecido los rastros de hielo.

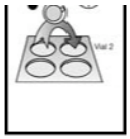
3. Cortar el final de la pajuela, colocar una jeringa de 1 ml con aire y luego cortar el otro final de la pajuela.

4. Expulsar el contenido de la pajuela dentro de una placa de Petri, mientras se observa por un microscopio de disección o lupa el final de la pajuela. Si no se ven todos los ovocitos, rellenar la pajuela rápidamente y lavarla suavemente. Los ovocitos se pueden haber pegado a los costados de las pajuelas.

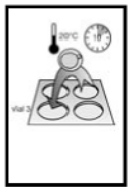


5. Una vez que los ovocitos son visualizados, deberán ser recubiertos de la solución de congelado y colocados en Cavidad A durante 5 minutos a temperatura ambiente.

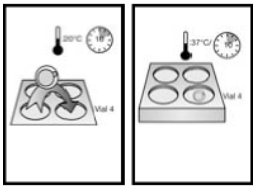
NOTA! Los ovocitos criopreservados son estresados osmoticamente y deberán ser manejados con sumo cuidado.



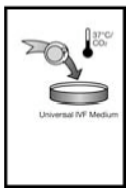
6. Los ovocitos son transferidos en una Cavidad B y mantenidos por unos 5 minutos adicionales en temperatura ambiente.



7. Los ovocitos son transferidos a una Cavidad C y mantenidos durante 10 minutos en temperatura ambiente.



8. Los ovocitos son transferidos a una Cavidad D y mantenidos en temperatura ambiente durante 10 minutos y a 37°C durante un tiempo adicional de 10 minutos. Esto se lleva a cabo para remover los últimos rastros de sacarosa y permitir gradualmente que el ovocito regrese a los 37°C.



9. Finalmente los ovocitos son colocados en Universal IVF Medium (N.Cat. 1030/1031) en una incubadora con control de CO_2 y a 37°C hasta la inseminación.

Congelado de pre-cigotos (2PN) y embriones de etapa de clivage

Selección de embriones:

- Los embriones no deberán estar en etapa impar de clivage o dividiéndose lentamente. (< 4 células a 48 h ó < 6 células a 72 h).
- Los blastómeros deberán ser de tamaño suficiente con citoplasmas homogéneos y membranas plasmáticas distinguibles como también se deberá distinguir el núcleo en alguno de los blastómeros.
- Un máximo de 30% de fragmentos.
- Zona pelúcida normal.

Si se lleva un registro detallado, cada unidad IVF podrá rastrear los embriones congelados y desarrollar así su propio criterio de selección basado en resultados clínicos.

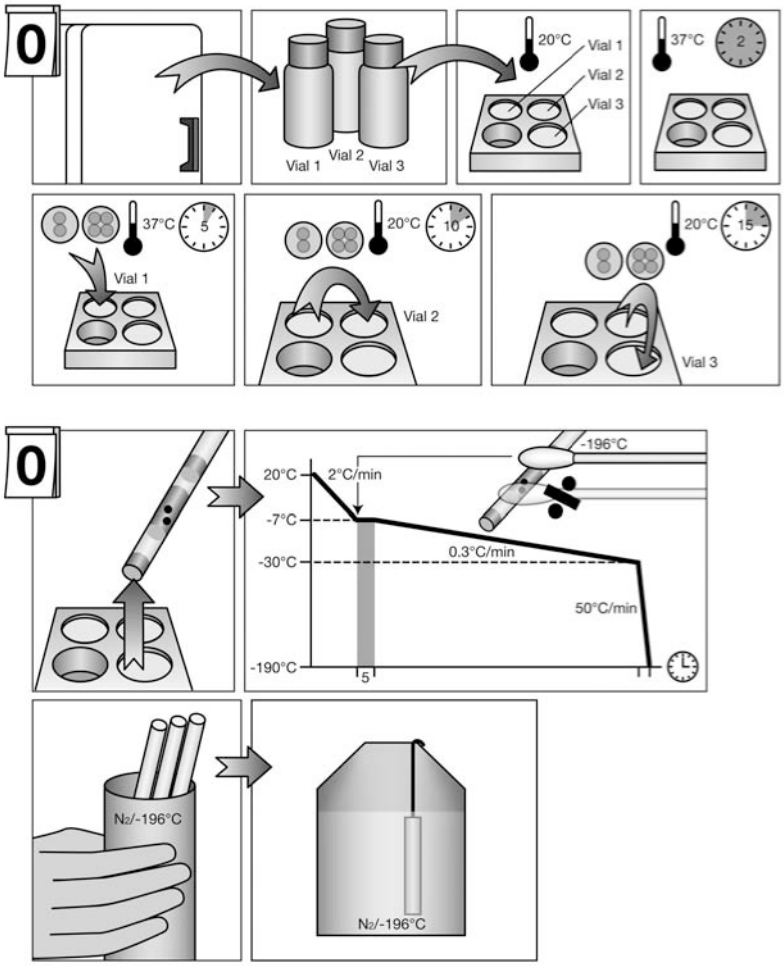
Embryo Freezing Pack: (N.Cat. 1026) es listo-para-ser-utilizado con 1,2-propanediol y protocolo de sacarosa de acuerdo con el método de J. Testart *et al.,* 1986. Una supervivencia optima de post-congelamiento es lograda con los zigotos en los embriones del día 2 (2-4 células). Las soluciones de congelado son formuladas utilizando tampón fosfato EFM, una modificación de PBS, con SSR® y HSA. La solución tampón de fosfato es utilizada para que todos los pasos sean llevados a cabo fuera de la incubadora a temperatura ambiente.

Manejo

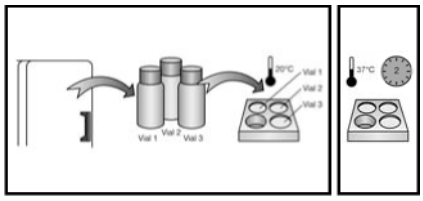
Calentar a temperatura ambiente previo al uso.

Rápida Referencia

Embryo Freezing Pack

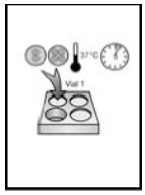


Instrucciones de uso (Embryo Freezing Pack):



1. Rotular las placas para las soluciones de congelado y pipetear volúmenes apropiados de la solución de congelado del Frasco 1, 2 y 3. Equilibrar a temperatura ambiente.

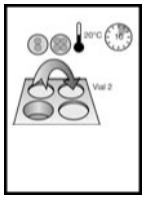
2. Rotular las pajuelas con la información correspondiente. No escribir directamente en las pajuelas dado que los solventes pueden penetrarlas y dañar los pre-cigotos/embriones. Utilizar cinta especial para poder potejer la pajuela. Si se utilizan tapones, la información del paciente deberá ser transferida directamente a los tapones previamente a que estos se inserten en las pajuelas.



3. Aspirar parte de la solución de congelado del Frasco 1 seguido por la aspiración de los pre-cigotos / embriones de la placa de cultivo.

4. Transferir los pre-cigotos / embriones, con lo menos posible de medio de cultivo, al Frasco 1 y marcar timer en (5 minutos).

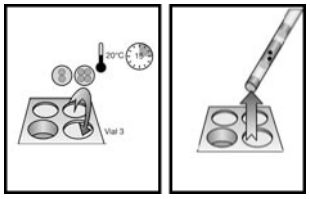
NOTA! Los pre-cigotos /embriones flotarán en la superficie del medio y se hundirán lentamente en el fondo de la cavidad. Es por eso que se considera una ventaja si usted los "atrape" con cuidado y los coloca en el fondo de la placa.



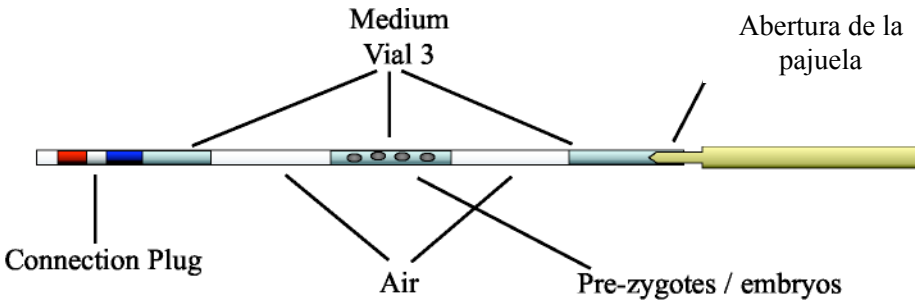
5. Justo antes de que pasen los 5 minutos colocar parte de la solución de congelado del Frasco 2 dentro de la pipeta. Cuando suene la alarma del timer con cuidado tomar los pre-zigotos/embriones y transferirlos a la solución de Frasco 2. Los pre-cigotos/embriones son dejados durante 10 minutos en la solución de Frasco 2.

6. Justo antes que los pre-cigotos/embriones sean transferidos a la solución del Frasco 3, el interior de las pajuelas es lavado con la misma solución pero de otra placa.

NOTA! Sacar aire de la jeringa que facilita remover el remanente de la solución de Frasco 3. No permitir que esta solución se ponga en contacto con el tapón.

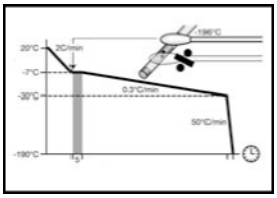


7. Tomar la solución del Frasco 3 y colocar dentro de una pipeta. Cuando suene la alarma con cuidado remover los embriones de allí y transferirlos a la solución del Frasco 3. Cuando los pre-cigotos/embriones se hayan hundido en el fondo del recipiente, cargar la pajuela con el pre-cigoto/embrión de la misma manera utilizada en el ET. Cuando la primera columna del medio toca el tapón la sellara, impidiendo todo movimiento futuro en la pajuela (ver el diagrama).



8. Sellar la abertura con un tapón para que el nitrógeno liquido no penetre dentro de la pajuela. Repetir esto mismo para todos los pre-cigotos/ embriones.

Nota! No se recomienda el sellado por calor ya que esto puede causar grietas en las pajuelas y liberar materiales embriotóxicos de las mismas.

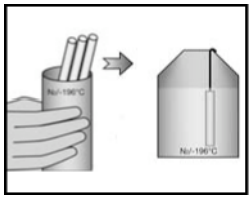


9. Colocar las pajuelas en la maquina de congelación e iniciar el programa de enfriado:

⟨ Enfriar desde temperatura ambiente hasta -7°C en pasos de 2ºC por minuto.

⟨ Cristalice manualmente y mantener la temperatura durante 5 minutos.

NOTA! Cuando la solución sea blanca el seeding ha sido iniciado. No cristalice la pajuela cerca del pre-zigoto / embrión y no la deje caer o sacudirla. La presencia de burbujas de aire en la pajuela pueden reducir la supervivencia del pre-cigoto/ embrión.



- Enfriar desde -7°C a -30°C en pasos de 0.3°C por minuto.
- Enfriar desde -30°C a -190°C en pasos de 50°C por minuto o sumergir en N_2.
- Transferir las pajuelas directamente al nitrógeno liquido y almacenarlas a -196°C.

NOTA! Se debe tener cuidado con el manejo de las pajuelas a bajas temperaturas ya que pueden descongelarse rápidamente.

Descongelado de pre-zigotos (2PN) y embriones en etapa de clivage

Los embriones deberán ser descongelados el día en el que son transferidos o el día previo, si el centro desea evaluar el potencial de desarrollo del embrión.

Se realiza temprano por la mañana el ultra sonido (US) en los pacientes a los que se le practica ¨Reemplazo de embrión congelado¨ (FER) para localizar la presencia del cuerpo luteo visible y una típica línea triple de endometrio sin hidrosalpinx. El día del US va a depender del largo del ciclo menstrual. El FER es llevado a cabo en ciclos naturales en mujeres con ciclos regulares. En mujeres de ciclos irregulares o ciclos largos se puede hacer reemplazo hormonal para sincronizar el endometrio.

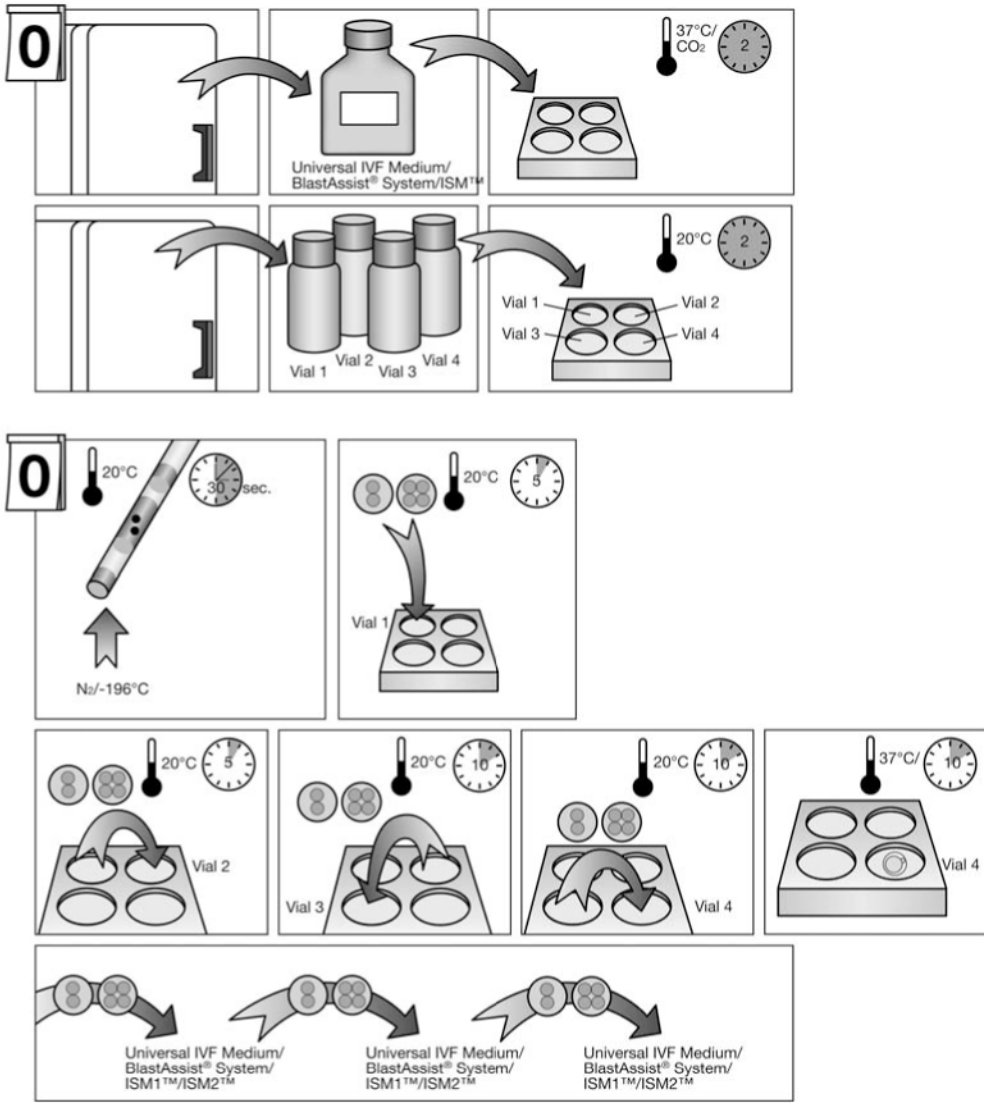
Embryo Thawing Pack (N. Cat. 1098) es listo-para-ser-utilizado con 1,2-propanediol y protocolos de sacarosa de acuerdo con el método J. Testart *et al.,* 1986. El Pack de descongelado de embriones esta también formulado utilizando fosfato Embryo Thawing Pack es formulado usando un tampón EFM y es por eso que provee un sistema complementario para el uso del Freezing Pack para congelación del embrión.

Manejo

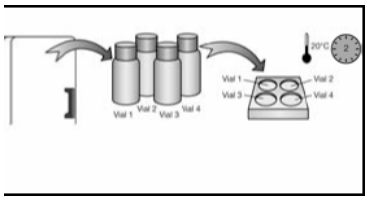
Calentar a temperatura ambiente previo al uso.

Rápida Referencia

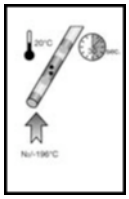
Embryo Thawing Pack



Instrucciones de Uso (Embryo Thawing Pack):



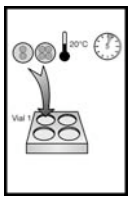
1. Rotular las placas con las soluciones de descongelado y pipetear los volúmenes apropiados de las soluciones de descongelado de los Frascos 1, 2, 3 y 4 dentro de las respectivas cavidades. Equilibrar a temperatura ambiente.



2. Remover la pajuela (s) del nitrógeno líquido y mantenerla a temperatura ambiente durante 30 segundos. Luego colocar la pajuela (s) en un baño de agua a 30°C durante 1 minuto.

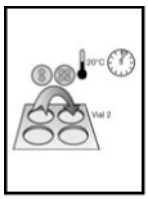
3. Cortar el final de la pajuela, colocar una jeringa de 1 ml con aire y luego cortar el otro final de la pajuela.

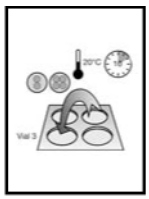
4. Expulsar el contenido de la pajuela a la placa de Petri mientras se observa el fondo de la pajuela desde el microscopio de disección. Si los pre-cigotos/ embriones no pueden ser vistos llenar rápidamente la pajuela y lavarla. Los pre-cigotos/ embriones pueden pegarse a los lados de la pajuela ocasionalmente.



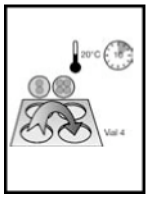
5. Una vez que se visualiza el pre-cigoto/ embrión deberá ser recuperado de la solución de congelamiento y colocado en el medio del Frasco 1 en temperatura ambiente durante 5 minutos.

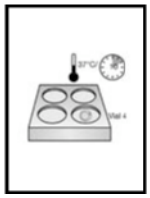
NOTA! Los pre-cigotos /embriones criopreservados son osmoticamente estresados y deberán se manipulados con sumo cuidado.





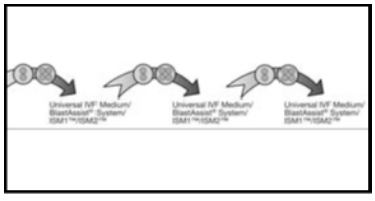
6. Colocar los pre-cigotos/ embriones en el medio del Frasco 2 a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego en el medio del Frasco 3 también a temperatura ambiente durante 10 minutos.





7. Los pre-cigotos o embriones son colocados en el medio del Frasco 4 durante 10 minutos a 37°C. Esto se realiza para remover los últimos rastros de sacarosa y permitir que el embrión vuelva a los 37a.C. gradualmente.

Nota! No colocar los embriones en una incubadora CO, dado que la capacidad del tampón del fosfato EFM es insuficiente para la atmósfera de CO_2.



8. Los pre-cigotos o embriones son colocados en un medio de cultivo que puede ser tanto Universal IVF Medium (N. Cat. 1030/103 1), como ISM1™/ISM2™ (N. Cat. 1050/105 1 or 1150/1151), o BlastAssist®System (N. Cat. 1039/1040) dependiendo de la etapa de desarrollo en la que estén y el día en que son transferidos. La placa es almacenada en la incubadora con control de CO_2 y a 37°C a la espera de la transferencia del embrión.

Congelación de Blastocistos (Día 5)

BlastFreeze™ y BlastThaw™ ayudan a optimizar los resultados generales del cultivo de blastocistos. La Dra. Irma Virant-Klun y el Dr. Tomaz Tomazevic junto con un grupo de IVF en el University Medical Centre de Ljubljana, Slovenia han desarrollado el medio y la metodología. Las fórmulas han sido utilizadas exitosamente para congelar y descongelar mórulas y blastocistos utilizando protocolos basados en el principio de "los dos pasos" publicado originalmente por Y. Ménézo y A. Veiga en 1997.

BlastFreeze™ (N. Cat 1053) es listo-para-ser-utilizado con glicerol y sacarosa para un protocolo de dos pasos de acuerdo con el método de I. Virant-Klun *et al.,* 2003. Optima supervivencia se logra post descongelado con blastocistos (día 5). Las soluciones de congelado son formuladas utilizando una modificación del tampón bicarbonato EBSS, con SSR® y HSA.

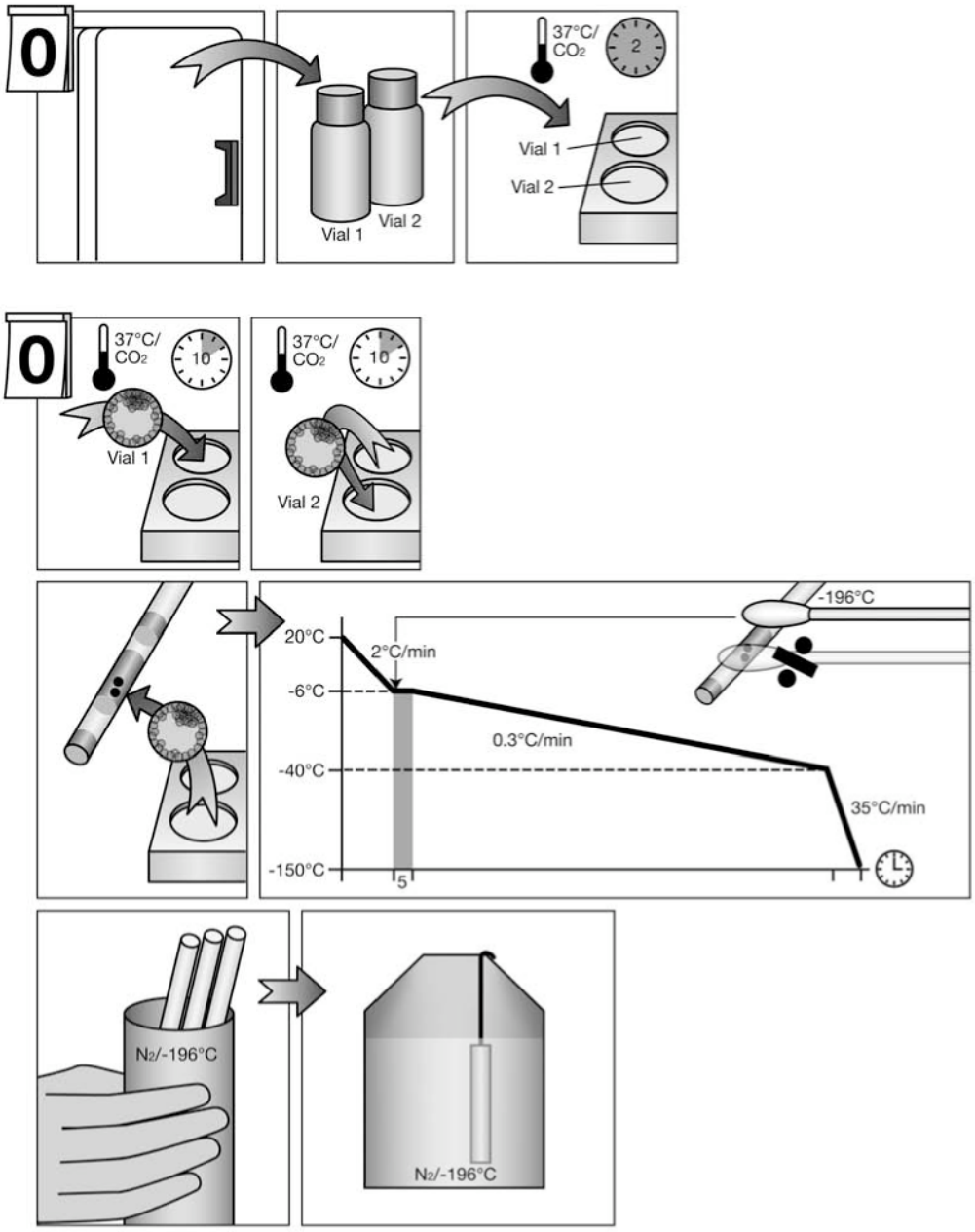
Nota! Todos los pasos son llevados a cabo en una incubadora de CO_2 y a 37°C.

Manejo

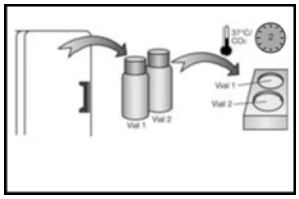
Equilibrar por un mínimo de 2 horas en CO_2 a 37°C previo al uso.

Rápida Referencia

BlastFreeze™



Instrucciones de uso (BlastFreeze^{TM})



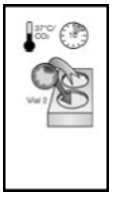
1. Rotular las placas para las soluciones de congelación y pipetear volúmenes apropiados de las soluciones de congelación del Frasco 1 y el Frasco 2 a la placa. Equilibrar en incubadora de CO_2 a 37°C.

2. Rotular las pajuelas con información especifica. No escribir directamente en las pajuelas ya que los solventes pueden penetrarla y dañar los embriones. Utilizar cinta para proteger la pajuela. Si los tapones son utilizados, la información del paciente podrá ser transferida directamente a los tapones antes de que sean insertados dentro de la pajuela.

3. Aspirar parte de la solución del pozo 1 y luego el blastocisto desde el medio de cultivo.

4. Transferir el blastocisto, con la menor cantidad posible de medio de cultivo al pozo 1 y colocar la placa en una incubadora de CO_2 durante 10 minutos.

NOTA! El blastocisto flotara en la superficie del medio y se hundirá lentamente en el fondo de la placa. Es por eso que es una ventaja"atrapar" con cuidado el blastocisto y colocarlo en el fondo del plato.



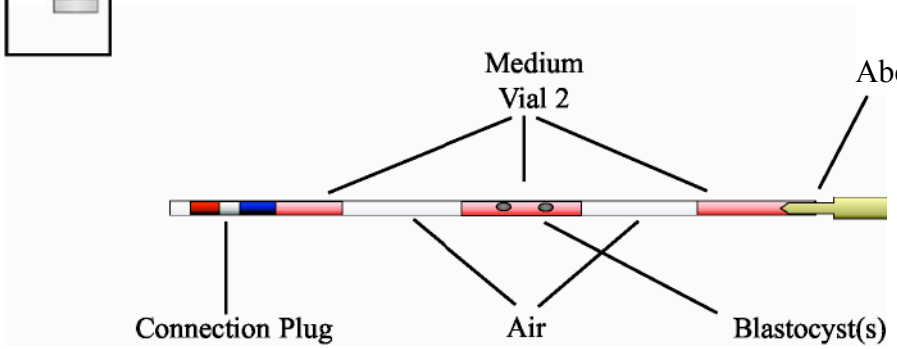
5. Justo antes que terminen los 10 minutos sacar parte de la solución de congelado del pozo 2 y colocarla en la pipeta. Cuando la alarma del timer suene, sacar con cuidado el blastocisto y trasferirlo a la solución del pozo 2. La placa es colocada una vez más dentro de la incubadora durante 10 minutos.

6. Justo antes que la alarma del reloj suene, la parte interna de las pajuelas deben ser lavadas con solución de congelación del pozo 2.

NOTA! Cargue un poco de aire en la jeringa para remover el remanente de la solución de pozo 2. No permitir que la solución se ponga en contacto con el tapón.

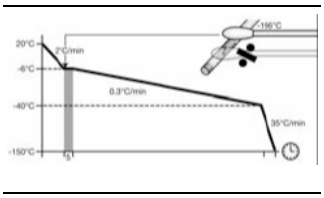
Ver pasos 7-9 en la próxima página

7. Transferir los blastocitos a las pajuelas (un máximo de 2 blastocitos por pajuela) utilizando el medio del pozo 2 como medio de transferencia. La pajuela es cargada de la misma manera que cuando se lleva a cabo la ET. Cuando la primera columna del medio se pone en contacto con el tapón se sellará, impidiendo todo movimiento posible en la pajuela. (ver diagrama).



8. Sellar la abertura de la pajuela con un tapón para que el nitrógeno liquido no entre dentro de la pajuela. Repetir esto con todos los blastocistos.

Nota! No se recomienda el sellado de las pajuelas por calor ya que puede formar grietas en las pajuelas y liberar materiales tóxicos de las mismas.



9. Comenzar el programa de enfriado como se describe a continuación:

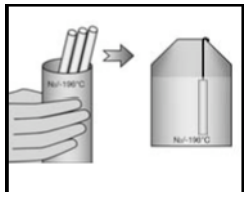
⟨ Enfriar desde temperatura ambiente hasta -6°C en pasos de 2ºC por minuto.

⟨ Seeding manual a -6°C.

NOTA! Cuando la solución es blanca, el seeding ha sido iniciado. No haga el seeding en la pajuela cerca del blastocisto (s) y no la deje caer o la agite. Si se producen burbujas de aire en la pajuela se va a reducir la supervivencia del blastocisto.

⟨ Enfriar desde -6°C hasta -40°C en pasos de 0.3°C por minuto.

⟨ Enfriar desde -40°C a -150°C en pasos de 35°C por minuto.



⟨ Transferir las pajuelas al nitrógeno liquido y almacenar a -196°C.

NOTA! Se deberá tener sumo cuidado con el manejo de las pajuelas en temperaturas bajas ya que pueden descongelarse rápidamente.

Descongelado de blastocistos

BlastThaw™ (N. Cat. 1054) es listo-para-ser-utilizado con glicerol y sacarosa para un protocolo de dos-pasos de acuerdo con el método de I. Virant-Klun *et al.,* 2003. Se alcanzará una supervivencia óptima del blastocisto post descongelado (Día 5). Las soluciones de descongelado son formuladas utilizando un tampón de bicarbonato modificado EBSS, con SSR® y garantiza un sistema para uso con BlastFreeze™.

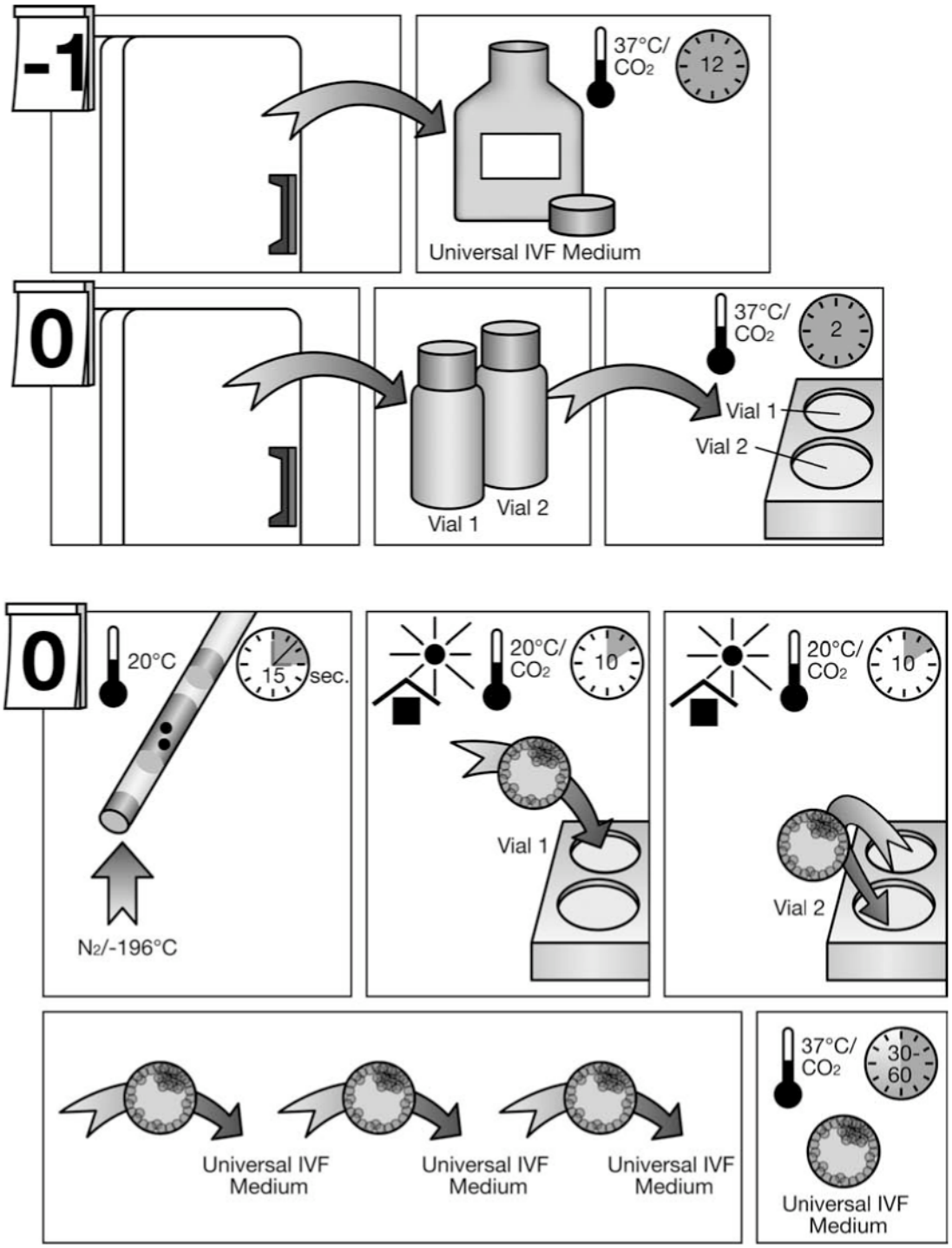
Nota! Todos los pasos son llevados a cabo a temperatura ambiente bajo una corriente de CO_2 y con los embriones protegidos de la luz.

Manejo

Equilibrar por un mínimo de 2 horas en CO_2 a 37°C previo al uso.

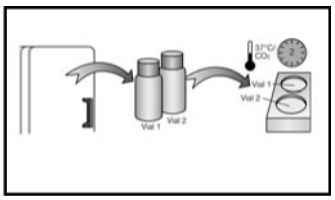
Rápida Referencia

BlastThaw™

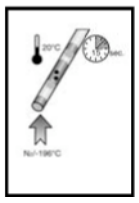


Instrucciones de uso (BlastThaw™):

El procedimiento de descongelado se lleva a cabo bajo una corriente de CO_2 en el aire y la intensidad de la corriente se regula de acuerdo al color del medio para mantener estabilidad de pH.



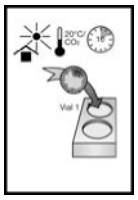
1. Rotular la placa con las soluciones de descongelado y pipetear volúmenes apropiados de la solución de descongelado del Frasco 1 y el Frasco 2 dentro de la placa.



2. Remover la pajuela(s) del nitrógeno líquido y mantener a temperatura ambiente durante 10-15 segundos.

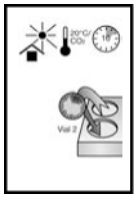
3. Cortar el final de la pajuela, colocar una jeringa de 1 ml con aire y luego cortar el otro extremo de la pajuela.

4. Expulsar el contenido de la pajuela dentro de la placa de Petri, mientras se observa el extremo de la pajuela desde un microscopio de disección. Si no se ve el blastocisto rellenar rápidamente la pajuela y lavarla suavemente. Los blastocistos se pueden adherir a la pared de la pajuela ocasionalmente.

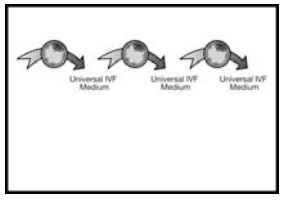


5. Un vez que el blastocisto es visualizado, deberá ser recuperado de la solución de congelamiento y colocado en el medio del pozo 1 durante 10 minutos en temperatura ambiente y bajo una corriente de CO_2. Los blastocistos son almacenados en la oscuridad.

NOTA! Los blastocistos criopreservados son osmoticamente estresados y deberán ser manejados con sumo cuidado.



6. Luego el blastocisto es transferido al medio del pozo 2 durante 10 minutos a temperatura ambiente y bajo una corriente de CO_2. Los blastocistos son almacenados en la oscuridad.

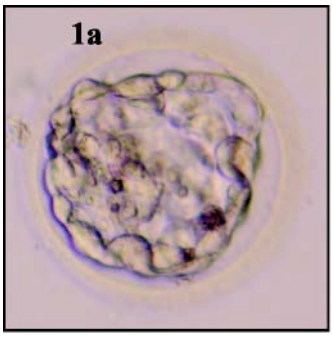


7. Luego del descongelado, colocar los blastocistos en Universal IVF Medium (N.Cat. 1030/1031) pre-equilibrado y aspirarlos 5 veces en la pipeta arriba y abajo para asegurarse un lavado completo.

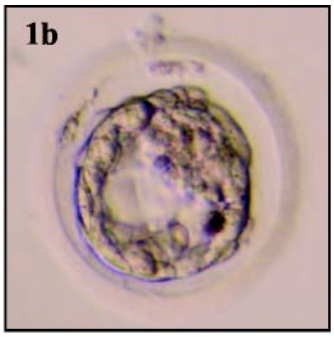
Nota! Esto deberá hacerse en unos pocos segundos.

8. Transferir a Universal IVF Medium pre-equilibrado y permitir la recuperación del blastocisto por un mínimo de 30-60 minutos en una incubadora CO_2 previo a la transferencia del embrión.

Blastocistos en soluciones de congelación

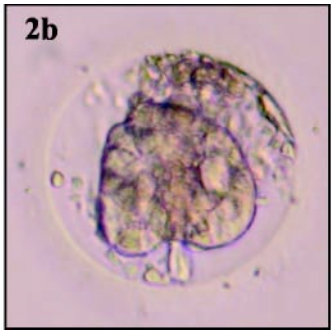


Blastocisto en solución 1 BlastFreeze™; Se ha contraído.



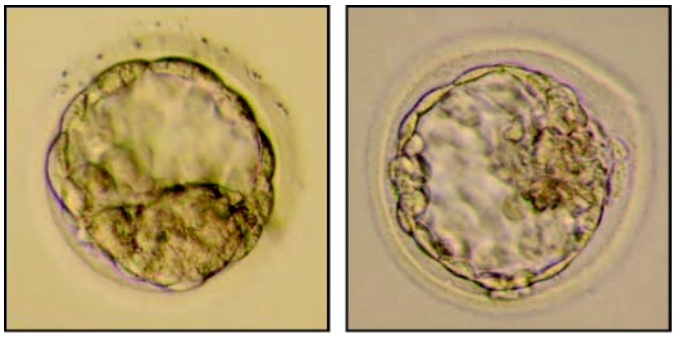
Mismo blastocisto en la solución 2 BlastFreeze™

Blastocisto en solución 1 BlastFreeze™ Se ha contraído.

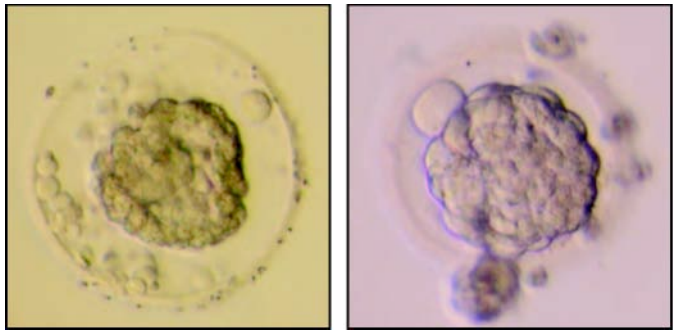


Mismo blastocisto en solución 2 BlastFreeze™

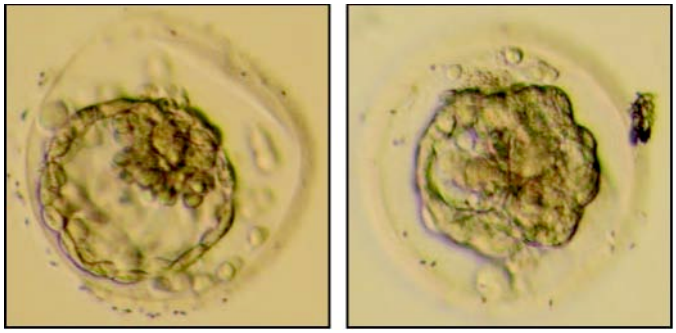
Blastocistos humanos no-contraídos post-descongelamiento. Ninguno presenta daños.



Blastocistos humanos contraídos post-descongelado. Ninguno presenta daños.



Blastocistos humanos contraídos y re-expandidos post-descongelado.
Ninguno presenta daños



Completamente re-expandidos 30 minutos post incubación en incubadora de CO_2

Parcialmente re-expandidos 30 minutos post incubación en incubadora de CO_2

Para mas información consultar el Mini-atlas de MediCult esponsorizado por la Dra. Irma Virant-Klun, "Fertilización *in vitro* del blastocisto humano: antes y después de la crió preservación".

Vitrificación

La vitrificación, o método para llegar al estado vítreo (-130 ° C para el agua), fue concebido como una potencial alternativa, en 1985, al congelamiento lento (Rall *et al.,* 1985). Ya que las lesiones de los ovocitos causadas por el congelamiento aparecen con el tiempo, se busca prevenir la formación de hielo y las lesiones por congelamiento rápidamente, logrando solidificar el agua intracelular antes de que esta se cristalice (Martino *et al.,* 1996). Las condiciones extra e intracelulares que existen y que permiten la crio-supervivencia, a -30°C en procesos de congelamiento lento, son imitadas durante el proceso de vitrificación con la diferencia de que estas se realizan a temperatura ambiente. Esto es posible mediante un periodo de equilibrio muy corto. La exposición de la célula a altas concertaciones de crioprotector es seguido de un congelamiento ultra rápido realizado sumergiéndola en nitrógeno liquido. La alta osmolaridad del medio de vitrificación deshidrata rápidamente la célula y la sumersión en el nitrógeno líquido solidifica la célula antes de que el agua intracelular restante tenga tiempo de formar cristales de hielo perjudiciales. Dos aspectos importantes de esta técnica son los elevados niveles de toxicidad del crioprotector a temperatura ambiente (Shaw *et al.,* 1992) y su habilidad para vitrificarse (congelarse) y calentarse (descongelarse) lo suficientemente rápido para evitar la formación de cristales y la desvitrificación (Vatja *et al.,* 1998). Ya se han producido niños sanos de ovocitos vitrificados por diversos métodos, demostrando así que estas preocupaciones pueden ser superadas. Otra ventaja de la vitrificación es que es posible observar todo el procedimiento en el laboratorio.

El McGill Cryoleaf™ es un dispositivo de vitrificación y almacenamiento. Este dispositivo cuenta con un sistema muy efectivo de manipulación que facilita la carga y el almacenamiento de ovocitos/ embriones. La seguridad durante el almacenamiento ha sido mejorada, los ovocitos y los embriones están doblemente protegidos del estrés y la contaminación, mediante un sistema de cubierta cerrada. El Dr. Chian y el Prof. Tan de la Universidad McGill de Montreal, desarrollaron el McGill Cryoleaf™ y los medios de vitrificación para MediCult.

MediCult vitrificación congelada:

Freeze Pack (Cat. No. 1118) Contiene 5x McGill Cryoleaf™ y un medio de equilibrado y vitrificación listo para usar, suficiente para el tratamiento de un paciente. Los medios contienen etilen glicol y 1,2-propandiol en HTF, en concentraciones crecientes.

Manipulación

Los medios en Freeze Pack están tamponados con HEPES y tienen un pH estable, para que todos los pasos puedan realizarse fuera de la incubadora a temperatura ambiente.

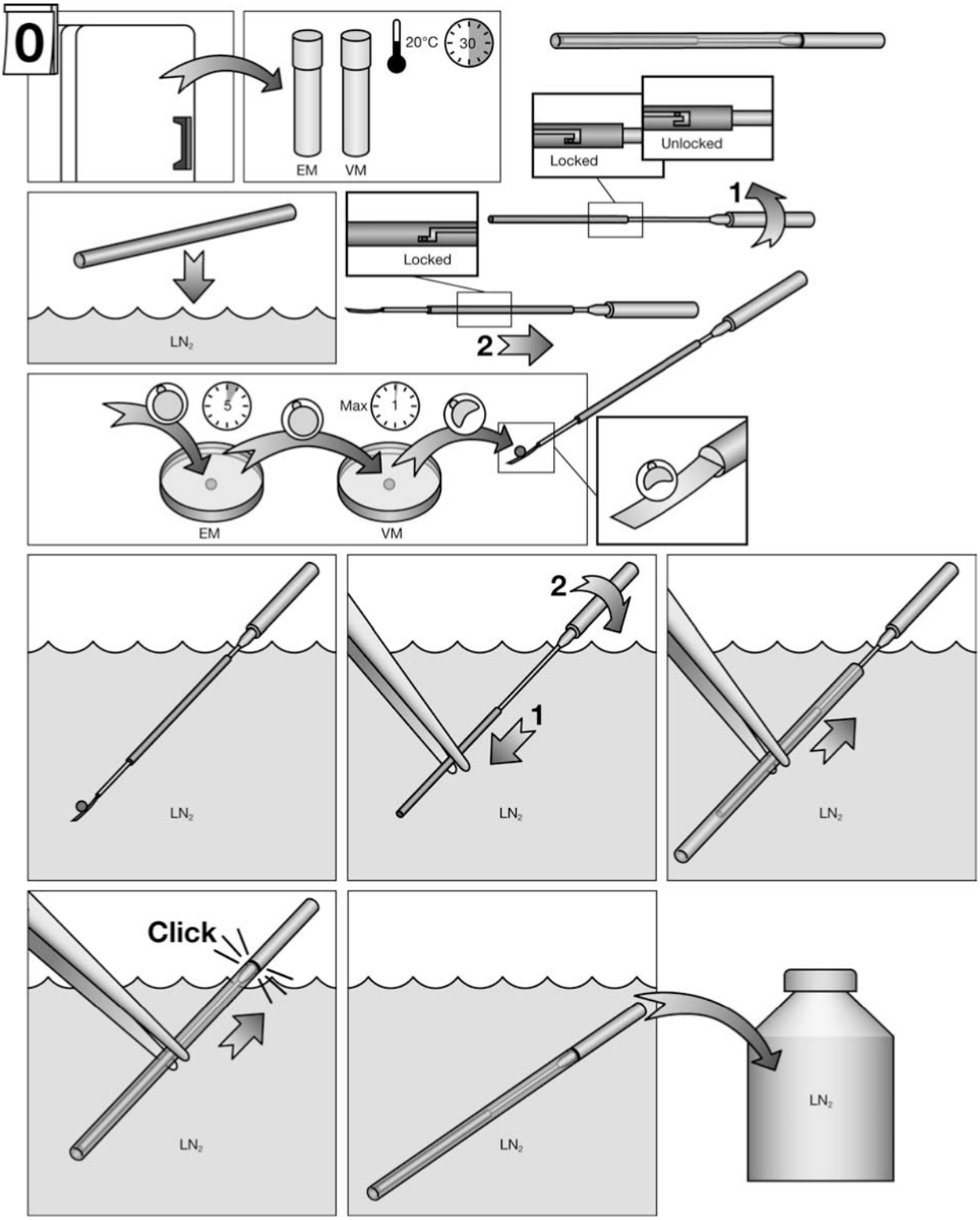
MediCult Vitrificación Thaw:

El Thaw Pack (Cat. No. 1119) incluye un medio de descongelado con sucrosa listo para usar, medios de disolución 1 & 2, ambos con decrecientes concentraciones de sucrosa y dos viales para lavar el medio con HSA.

Manipulación

Los medios que se encuentran en el Thaw Pack están tamponados con HEPES y tienen un pH estable, para que todos los pasos puedan realizarse fuera de la incubadora a temperatura ambiente. Calentar a temperatura ambiente previo a su uso, con la excepción del medio de descongelado que debe calentarse a 37°C antes de ser usado.

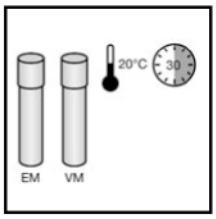
Rápida Referencia
MediCult Vitrificación Freeze



Instrucciones de uso.

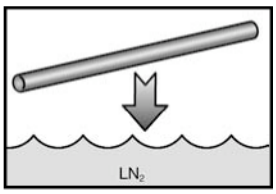
(MediCult Vitrification Freeze):

MediCult recomienda el uso de un recipiente adecuado para el nitrógeno líquido (LN_2) el cual puede ser esterilizado, por ejemplo un vaso de precipitados de pirex. También recomienda el uso de LN_2 estéril para evitar todo riesgo de contaminación. La carga máxima de McGill Cryoleaf™ recomendada es de 2-3 ovocitos o embriones.

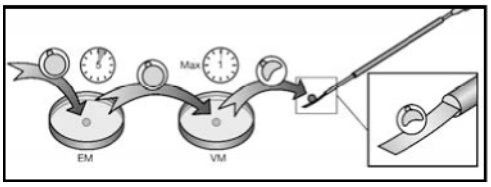


1. EM y VM deben estar equilibrados a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos.

2. Use 1 ml del medio en una placa (Ej.: 4 pozos) adecuada para la vitrificación.



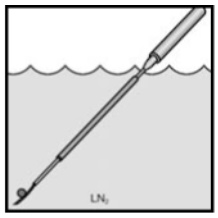
3. Sumergir la cubierta exterior del McGill Cryoleaf™ en el baño de LN_2.



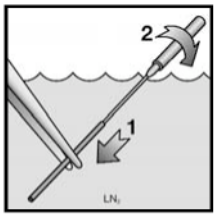
4. Usando una pipeta adecuada, transferir 2-3 ovocitos denudados o embriones en el EM y dejar que se equilibren por 5 minutos (los ovocitos o embriones se reducen en tamaño inicialmente y luego vuelven a su forma anterior)

5. Transferir los ovocitos o embriones al VM, donde deben quedarse durante menos de un minuto (los ovocitos o embriones vuelven a reducirse en tamaño).

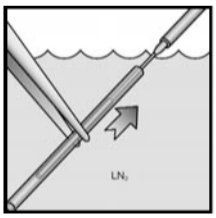
6. Cargar rápidamente los ovocitos o embriones en la punta del McGill Cryoleaf™ usando la misma pipeta y la menor cantidad de VM posible. El McGill Cryoleaf™ debe estar seco durante el proceso. Asegurarse de remover el exceso de VM cuidadosa y rápidamente usando la pipeta.



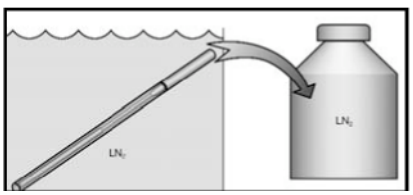
7. Insertar el McGill Cryoleaf™ con los ovocitos o embriones directamente en el nitrógeno liquido (LN_2).



8. Deslizar cuidadosamente la manga protectora (verde) sobre la punta con los ovocitos o embriones y cerrar girando. Tener en cuenta que el McGill Cryoleaf™ debe estar sumergido en LN_2 todo el tiempo.

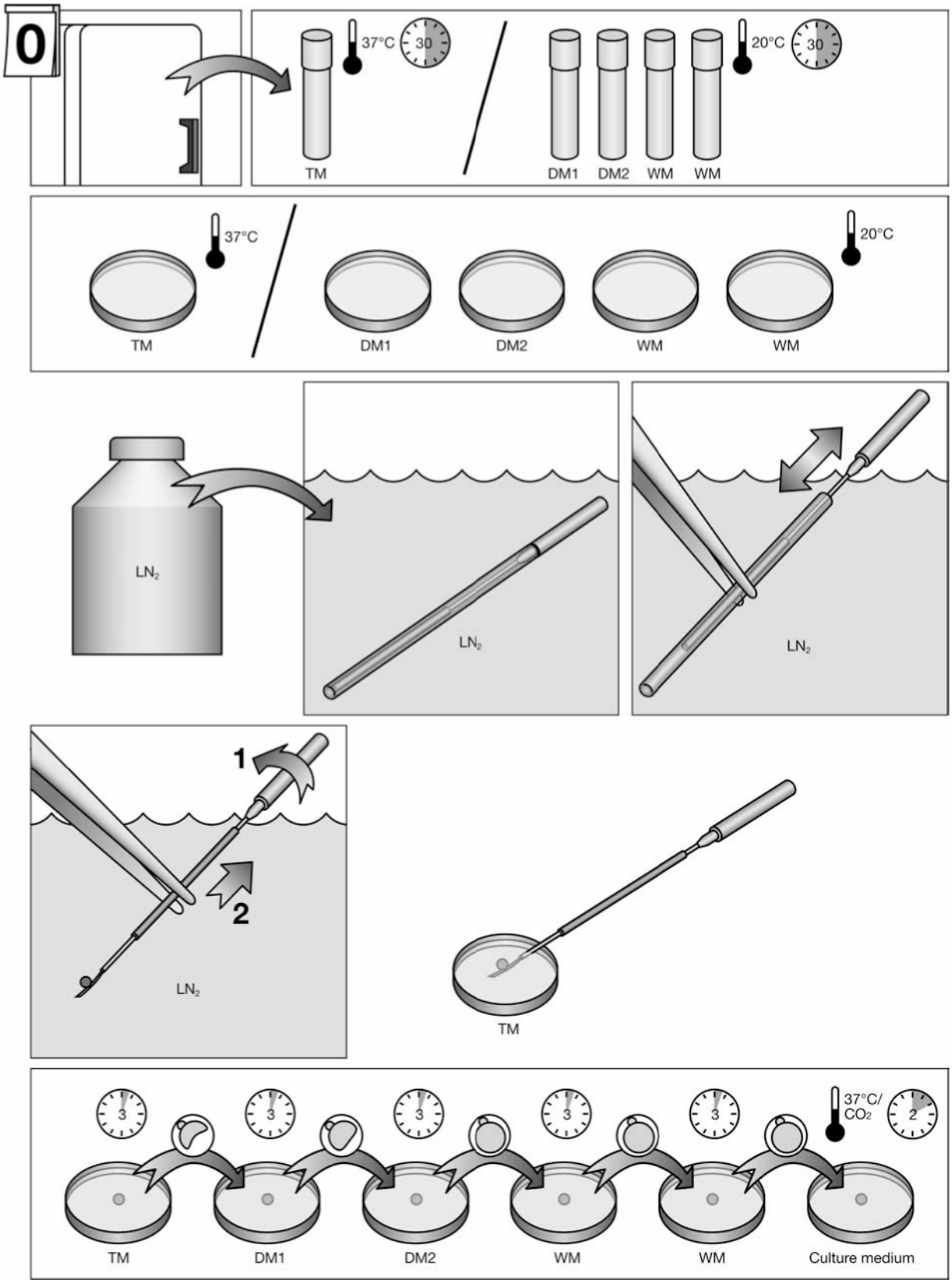


9. Insertar el McGill Cryoleaf™ en la cubierta externa y presionar con fuerza. Tener en cuenta que el McGill Cryoleaf™ debe estar sumergido en LN_2 todo el tiempo.

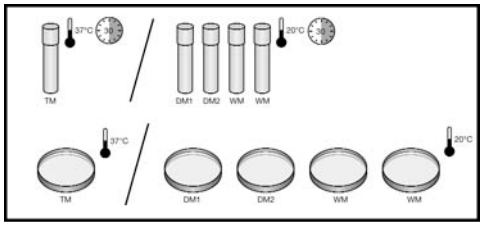


10. Transferir al tanque de almacenamiento.

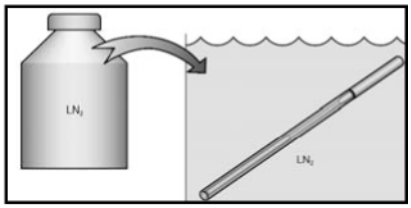
Rápida Referencia
MediCult Vitrification Thaw



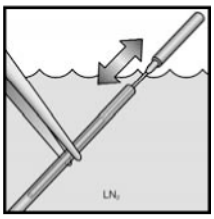
Instrucciones de uso
(MediCult Vitrification Thaw):



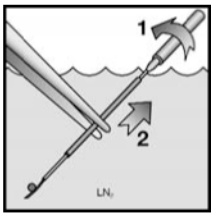
1. Precalentar el TM a 37°C mientras los otros medios se mantienen a temperatura ambiente.



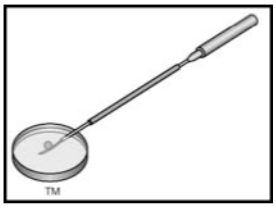
2. Recoger el McGill Cryoleaf™ del contenedor de almacenamiento y ubicarlo en un baño de LN_2.



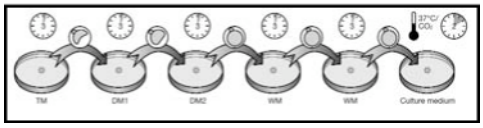
3. Utilizando fórceps, remover la cubierta exterior del McGill Cryoleaf™. Tener en cuenta que el McGill Cryoleaf™ debe estar sumergido en LN_2 todo el tiempo.



4. Abrir la parte interna con la punta y deslizarla hacia arriba, exponiendo la punta. Asegurarse que el McGill Cryoleaf™ se mantenga sumergido en LN_2.



5. Sacar el McGill Cryoleaf™ del LN_2 y transferir rápidamente los ovocitos o embriones al TM (2 ml a 37°C). Los ovocitos o embriones se separaran del McGill Cryoleaf™ y serán transferidos al TM, donde deben permanecer por un máximo de 3 minutos (en este punto los ovocitos o embriones siguen estando reducidos en tamaño.



6. Usando la pipeta adecuada, transferir los ovocitos o embriones a 2 ml DM-1 por tres minutos (en este punto los ovocitos o embriones han recuperado parcialmente su forma)

7. Transferir los ovocitos o embriones a 2 ml DM-2 por tres minutos (en este punto los ovocitos o embriones siguen recuperando su forma)

8. Transferir los ovocitos y embriones a 2 ml WM. Lavar por 3 minutos (en este punto los ovocitos o embriones recobran completamente su forma original)

9. Transferir los ovocitos o embriones a 2 ml WM por 3 minutos.

10. Transferir los ovocitos o embriones a un medio de cultivo pre-equilibrado. Permitir que reposen en la incubadora por 2 horas antes del próximo paso.